Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Trennung vermehrungsanregender Stoffe aus Hefeextrakten von Saccharomyces cerevisiae

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Walter Wortberg
aus Essen

Marburg 1968

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Trennung vermehrungsanregender Stoffe aus Hefeextrakten von Saccharomyces cerevisiae

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Walter Wortberg
aus Essen

Marburg 1968

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen
Fakultät der Philipps-Universität
Marburg a.d. Lahn am: 29.2.1968

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert
Referent: Prof. Dr. med. W. Schmid
Correferent: Prof. Dr. med. H. W. Kunz

M E I N E N E L T E R N

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A EINLEITUNG	1
B EXPERIMENTELLER TEIL	4
I. Methode	4
1. Herstellung verschiedener Extrakte	4
a) Herstellung des Nährmediums für den Perchlorsäuretrockenextrakt	5
b) Herstellung des 1,9 %igen Perchlorsäuretrockenextraktes	7
c) Herstellung des 1,9 %igen synchronisierten Trockenkochsaftes (Extrakt E)	9
d) Gewinnung des 1,8 %igen 3 mal gewaschenen Trockenkochsaftes (Extrakt D)	10
e) Gewinnung des 1,2 %igen nicht synchronisierten Trockenkochsaftes (Extrakt C)	10
2. Keimversuche	10
a) Versuchsanordnung	10
b) Temperaturkonstanz	11
c) Durchströmung mit Luft	11
d) Nährmedium	11
3. Bestimmungsmethoden von Zellzahl, Sprossung, freien Nucleotiden, RNS und DNS nach Zusatz des 1,9 %igen Perchlorsäuretrockenextraktes und des 1,9 %igen synchronisierten Trockenkochsaftes	12
a) Zellzahl und Sprossung	12
b) Herstellung und Bestimmung der freien Nucleotide	12
c) RNS - Bestimmung	13
d) DNS - Bestimmung	13
4. Säulenchromatographische Trennung von Perchlorsäuretrockenextrakt und synchronisiertem Kochsaft	14

Seite

a) Apparatur zur Säulenchromatographie (kleine Säule) 14

b) Apparatur zur Säulenchromatographie (große Säule) 16

c) Regeneration und Füllung der Säule 17

5. Weiterverarbeitung der Eluate nach Säulenchromatographie 19

a) Aufarbeitung der wässerigen Fraktionen 19

b) Aufarbeitung der säurelöslichen Fraktionen 19

6. Schichtchromatographie der säurelöslichen und wässerigen Fraktionen 21

a) Sprühgerät 21

b) Adsorptionsmittel 23

c) Fließmittel 24

II. Ergebnisse 25

1. Wirkung der Extrakte auf die Sprossung 25

a) Wirkung des Extraktes A (Perchlorsäuretrockenextrakt) 27

b) Beeinflussung der Sprossung durch Kochsäfte verschiedener Zubereitung 30

c) Simultanvergleich von Perchlorsäureextrakt (Extrakt A) und Kochsaft (Extrakt E) aus synchronisierter Hefe mit Bestimmung von Zellzahl, Sprossung, RNS, DNS und freien Nucleotiden 32

2. Beeinflussung der Sprossung durch säulenchromatographisch aufgetrennte Fraktionen 33

a) Vergleich der Elutionskurve von Extrakt E mit Extrakt A (Abb.5 und 6) 33

b) Beeinflussung der Sprossung durch das Gesamteluat 36

c) Beeinflussung der Sprossung durch die mit Wasser eluierten Vorfraktionen 38

Seite

d) Beeinflussung der Sprossung durch die säurelösliche Fraktion 42

3. Beeinflussung der Sprossung durch schichtchromatographisch aufgetrennte Banden 45

a) Beeinflussung der Sprossung durch Banden der wässerigen Vorfraktionen Vo V und Vo VI 45

b) Beeinflussung der Sprossung durch Banden der säurelöslichen Fraktion N IX 47

c) Wirkung von Testsubstanzen 50

4. Versuche zur Identifizierung von Einzelsubstanzen aus einigen Fraktionen 52

a) Untersuchungen an den wässerigen Vorfraktionen 52

b) Untersuchungen an den säurelöslichen Fraktionen 56

C DISKUSSION 60

D ZUSAMMENFASSUNG 66

E LITERATURVERZEICHNIS 68

F TABELLEN Nr. 6 - 17

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
NAD	Nicotinamid-Adenin-dinucleotid
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat

EINLEITUNG

Ein Ziel der biochemischen Forschung ist die Aufklärung der Reaktionsmechanismen der im menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Organismus ablaufenden chemischen Prozesse, die zur Zellteilung führen.

Die Zellvermehrung birgt auch heute noch viele ungeklärte Probleme in sich. Zwar ist der Ablauf der Zellteilung von der morphologischen Seite her recht gut bekannt, die parallel dazu ablaufenden submikroskopischen biochemischen Stoffwechselreaktionen, die ja eigentlich erst zu den sichtbaren morphologischen Veränderungen führen, sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Man kennt heute schon gewisse Vorbedingungen, die erfüllt sein müssen, damit die Zellen überhaupt die Möglichkeit haben, sich zu teilen, nicht aber die eigentlichen Stimulatoren. Zu diesen "Möglichkeitsfaktoren"[3] gehören z. B. die Verdopplung der DNS seit der letzten Mitose und die Bildung der RNS und der Proteine.

Ein viel diskutiertes Problem ist auch die Frage, ob eine aerobe Glycolyse eine wesentliche Voraussetzung der Zellteilung ist oder ob die Zellvermehrung auch anaerob erfolgen kann. Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen ist auch bei Zellarten, die eine hohe aerobe Glycolyse wie die Hefezellen besitzen, ein Sauerstoffminimum zur Zellvermehrung notwendig. Dieses wurde von SCHMID[21] am Beispiel der Hefe gezeigt. Es muß allerdings offenbleiben, ob nicht von einem bestimmten

Zeitpunkt an die Zellvermehrung ohne Sauerstoff ablaufen kann.

Offen ist auch immer noch die eigentlich wichtigste Frage, wann der Prozeß des Zellwachstums in den der Zellvermehrung umschlägt. Damit stellt sich auch die Frage, welche endogenen und exogenen Faktoren in einer an sich teilungsbereiten Zelle zu einem definierten Zeitpunkt die Zellteilung auslösen.

Als einige solcher Verwirklichungsfaktoren[3)] wird die Verdopplung des Genbestandes in der Interphase und möglicherweise eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation diskutiert. Vielleicht spielt auch das Verhältnis zwischen dem in der dritten Potenz zunehmenden Zellvolumen und der nur in der zweiten Potenz größer werdenden Oberfläche, die beim Zellwachstum somit kleiner wird (ungünstigere Nährbedingungen), eine Rolle.

Ferner ist an den Einfluß von Zellzerfallsstoffen (Wundhormonen) und an die Teilung anregenden mechanischen Wundreize (durch Anfrischen der Wunden durch den Chirurgen) zu denken, wobei wahrscheinlich ebenfalls Stoffe frei werden. In der Gewebekultur setzt man deshalb dem Kulturmedium oft noch Gewebeextrakte zu, welche wachstums- und damit vermehrungsfördernde Stoffe enthalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hefezellen gearbeitet. Nachdem es in vorausgegangenen Arbeiten (SCHMID[20)], STOSSECK[24)] und JACOBI[11)]) gelungen war, Zellwachstum und Zellvermehrung voneinander abzutrennen und durch fraktioniertes Zentrifugieren synchronisierte vermehrungsfähige Hefezellen zu gewinnen, konnte nunmehr versucht werden, Zellextrakte herzustellen, die solche teilungsbereiten Zellen zur Sprossenbildung anregen.

Da es sich bei den Zellextrakten häufig um eine Mischung von Substanzen handelt, für deren Auftrennung noch keine definierte Methode bekannt ist, wurde zunächst die Wirkung eines bekannten Perchlorsäureextraktes auf die Sprossung untersucht.

Dieser Extrakt erschien als eine geeignete Ausgangsbasis, da er nach HURLBERT[10], SCHMITZ[22] und STOSSECK[24] Basen, Nucleoside und Nucleotide enthält, welche als Bausteine der DNS und RNS vermutlich an der Zellteilung beteiligt sind.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, diesen Totalextrakt in Einzelkomponenten aufzutrennen und deren Wirkung auf die Sprossung zu untersuchen.

B EXPERIMENTELLER TEIL

I. Methode

1. Herstellung verschiedener Extrakte

Alle Versuche wurden mit käuflicher Bäckerhefe durchgeführt. Nach Angaben der Herstellerfirma (MOORMANN: Werne/Lippe) handelt es sich um eine Mischung von zwei Stämmen von Saccharomyces cerevisiae. Um möglichst frische und damit wachstums- und sprossungsfähige Zellen zu erhalten, wurde die Hefe alle sieben Tage neu vom Großhandel bezogen und bis zur Verarbeitung bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt. Über die Lagerzeiten bei der Herstellerfirma war nichts bekannt.

Wie die Versuche von STOSSECK[24] gezeigt haben, wachsen Hefezellen zunächst bis zu einer durchschnittlichen Zellgröße von 5,5 - 6,0 µ (Micron) heran und beginnen dann zu sprossen.

Für die folgenden Versuche wurden solche sproßbereiten Zellen benutzt, die durch Synchronisierung nach JACOBI[11] hergestellt wurden. Zur Prüfung des Gewichtes der so gewonnenen synchronisierten Zellen wurden diese durch einen Membranfilter mit einem mittleren Porendurchmesser von 2 µ filtriert und dann gewogen. Aus 320 g Ausgangshefe wurden 25 - 30 synchronisierte Hefe gewonnen, die in einer physiologischen Kochsalzsuspension bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

a) Herstellung des Nährmediums für den Perchlorsäure-trockenextrakt

Das Nährmedium für die Perchlorsäureextraktherstellung setzte sich aus 90 % Nährsalzlösung + 10 % Hefekochsaft zusammen.

Herstellung des Kochsaftes nach STOSSECK[24], DEHNER[7] und JACOBI[11]

200 g Frischhefe wurden mit 300 ml aqua demin. in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben suspendiert (66 %ig) und 15 Minuten bei 100° C gehalten. Anschließend 30 Minuten bei 1900 x g zentrifugiert und der klare Überstand abgegossen. Dieser wurde bis zur weiteren Verwendung in einer Tiefkühltruhe bei - 20° C aufbewahrt.

Um eine feste Bezugsgröße zu gewinnen, wurden in 6 Versuchen je 10 ml für 24 Stunden in die Gefriertrocknung gegeben. Pro ml Hefekochsaft wurden 36 mg Trockensubstanz gewonnen (s. Tabelle 1). Bezogen auf Trockensubstanz handelt es sich um einen 3,6 %igen Trockenkochsaft (Extrakt B).

Die Nährlösung wurde nach WILLIAMSON[26] hergestellt. Sie enthielt:

Glucose x H_2O	0,170 molar	= 34,00 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,015 molar	= 1,98 g
KCl	0,010 molar	= 0,74 g
$MgCl_2 \times 6 H_2O$	0,0025molar	= 0,51 g
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,0024molar	= 0,35 g

Der Nährlösung wurden 20 % Citrat-Phosphat-Puffer (pH: 5,8) zugesetzt:

$Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$	0,38 molar	= 27,20 g
Citronensäure x H_2O	0,12 molar	= 5,04 g

und mit aqua demin. auf 1000 ml aufgefüllt.

100 ml Nährlösung enthielten also: 90 ml Nährsalz + 10 ml Kochsaft (= 360 mg des 3,6 %igen Trockenkochsaftes). Kochsaft und Salzlösung wurden zur besseren Haltbarkeit in einer Tiefkühltruhe bei -20° C aufbewahrt.

T a b e l l e 1

Bestimmung der Trockensubstanz nach Einengung der einzelnen Extrakte in der Gefriertrocknung (angegeben in mg Trockensubstanz / ml Extrakt und in g feuchter Ausgangshefe / ml Extrakt)

% auf feuchte Hefe bezogen	21 %iger Perchlorsäureextrakt = 0,21 g/ml	21 %iger synchronis. Kochsaft = 0,21 g/ml	21 %iger 3 mal gewaschener Kochsaft = 0,21 g/ml	21 %iger nicht synchronisierter Kochsaft = 0,21 g/ml	66 %iger nicht synchronisierter Kochsaft = 0,66 g/ml
% auf Trockensubstanz bezogen	1,9 %iger Perchlorsäuretrockenextrakt	1,9 %iger synchronis. Trockenkochsaft	3 x gewaschener 1,8 %iger Trockenkochsaft	1,2 %iger nicht synchronisierter Trockenkochsaft	3,6 %iger nicht synchronisierter Trockenkochsaft
Probe	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
1	18	19	19	10	36
2	18	19	18	12	35
3	18	19	17	12	36
4	18				
5	20		18	12	36
6	21		19	14	35
7	22				
8	19				
Mittelwert $\bar{x}$	19 Extrakt A	19 Extrakt E	18 Extrakt D	12 Extrakt C	36 Extrakt B

b) Herstellung des 1,9 %igen Perchlorsäuretrockenextraktes

Die Herstellung des Extraktes erfolgte in modifizierter Form nach SCHMITZ[22] und STOSSECK[24].

Für jeden Versuch wurden 2,1 g synchronisierte Hefe in 100 ml Nährlösung aufgeschwemmt. Diese 2,1 %ige Hefesuspension entspricht einer Zellzahl von $2 - 2{,}5 \times 10^5$ Zellen/mm^3. Bestimmung der Zellzahl mit dem Celloscope der Fa. LARS LJUNGBERG u.Co., Stockholm (s. ARNOLD[1]).

Die 2,1 %ige Hefesuspension wurde in einem Wasserbad von 30° C inkubiert. Genaue Beschreibung s. Keimversuch (S.11). Die Herausnahme der Hefesuspension aus dem Belüftungsbad erfolgte nach 130 - 150 Minuten bei einer Sprossenbildung von 80 - 90 %. Um die Nährlösung möglichst schnell von den Hefezellen zu trennen, wurde die Hefesuspension sofort nach Ablauf der Keimzeit in eine vorgekühlte Porzellannutsche gegeben und mittels einer Wasserstrahlpumpe durch einen Membranfilter abgesaugt. Membranfilter und Hefe wurden sofort in flüssige Luft geworfen. Der Frier-Stop erfolgte so je nach Menge der Ausgangssuspension in 2 - 10 Minuten.

Zu der in flüssiger Luft eingefrorenen Hefe wurden anschließend pro 2,1 g Ausgangshefe 10 ml einer 6 %igen kalten Perchlorsäure (+ 2° C) gegeben und miteingefroren. Überprüfungen des Gewichtes vor und nach der Belüftungsphase hatten eine Gewichtszunahme von 0,3 - 0,4 g ergeben. Anschließend wurde bei 20° C im Wasserbad aufgetaut. Dauer ca. 15 - 20 Minuten. Nach 30 Minuten Extraktion auf dem Magnetrührer in der Kälte bei + 2° C erfolgte die Trennung des Extraktes von den Hefezellen durch Zentrifugieren bei 3500 x g. Der Überstand wurde dekantiert und mit kalter 3 n KOH neutralisiert (pH: 7,0). Das hierbei ausgefallene $KClO_4$ wurde in der Christzentrifuge bei + 2° C 30 Minuten bei 3500 x g abzentrifugiert. Der Überstand, der unter anderem nach SCHMITZ[22] die freien Nucleotide enthält, wurde bei 250, 260 und 280 mμ gemessen (Verdünnung 1 : 30 [0,1 ml Extrakt + 2,9 ml aqua demin.]).

Die Quotienten aus 250/260 und 280/260 dienten zur vorläufigen Charakterisierung.

Die Mittelwerte aus 9 Versuchen ergaben eine Ext. von:

250 mμ 0,6078
260 mμ 0,7057
280 mμ 0,2964

Die entsprechenden Quotienten dazu:
250/260: 0,8612; 280/260: 0,4200.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde der Extrakt im Eisschrank aufbewahrt. Um eine feste Bezugsgröße zu gewinnen, wurden in 4 Versuchen je 2 Proben von 10,0 ml des 21 %igen Perchlorsäureextraktes((% auf feuchte Hefe bezogen) für 24 Stunden in die Gefriertrocknung gegeben. Aus 10,0 ml Extrakt erhielten wir so 190,0 mg Trockensubstanz, d.h. 1,0 ml Extrakt enthält 19,0 mg Trockensubstanz (s. Tabelle 1). Der Extrakt ist also 1,9 %ig. Er wurde daher in Zukunft als 1,9 %iger Perchlorsäuretrockenextrakt bezeichnet (Extrakt A).

Da der Gehalt an freien Nucleotiden interessierte, wurde außerdem eine Umrechnung auf μM Nucleotid/10,0 ml Extraktansatz vorgenommen, indem in einem Versuch der Perchlorsäureextrakt bei 260,0 mμ gemessen und mit der Orzinreaktion nach MEYBAUM[13] Pentosebestimmungen durchgeführt wurden. Aus einer aufgestellten Riboseeichkurve ergab sich, daß 0,6160 μM Ribose / Meßansatz von 3,0 ml einer Ext. von 1,0 entsprach.
(Ext.: 1,0 = 92,5 Ribose. MG. der Ribose: 150,13).

Da zu dieser Bestimmung 0,1 ml von 10,0 ml Gesamtextrakt verwendet wurden, gilt:

Ext. x 0,616 x 10 x 10 = μM Ribose / 10,0 ml Ansatz
also 1,135 x 0,616 x 100 = μM Ribose / 10,0 ml Ansatz.

10,0 ml Perchlorsäureextrakt enthalten demnach 69,916 μM Ribose (Umrechnung auf μM Nucleotid s.STOSSECK[24]).

Herstellung des Orzinreagenz

100,0 mg $FeCl_3 \times 6 H_2O$ in 100,0 ml 37 %iger HCl lösen (D = 1,19)

Dazu: 3,5 ml einer 6 %igen Orzinlösung in Äthanol (rein)
= 0,3 g Orzin in 5,0 ml Äthanol
(8 Tage in dunkler Flasche haltbar)

Ansatz: 0,1 ml Extrakt
+ 0,9 ml H_2O
+ 2,9 ml Orzinreagenz
} 15 Minuten im Wasserbad kochen

Anschließend abkühlen bei 20° C und messen der Ext. in einer 1 cm QS-Küvette bei 665 mμ gegen Leerwert.

c) Herstellung des 1,9 %igen synchronisierten Trockenkochsaftes (Extrakt E)

Nachdem es gelungen war, einen Perchlorsäuretrockenextrakt herzustellen, mit dessen Hilfe die Hefezellen zur Sprossenbildung angeregt werden konnten, wurden vergleichende Untersuchungen mit diesem Perchlorsäureextrakt und mit Trockenkochsäften verschiedener Zubereitung angestellt. Um unter biologisch gleichen Bedingungen zu arbeiten, wurde zunächst ein Kochsaft aus synchronisierten Hefezellen benutzt, der im Parallelversuch mit dem Perchlorsäureextrakt hergestellt wurde. Nach der Membranfilterung wurde die Hefe nicht in flüssige Luft, sondern in heißes Wasser gegeben und 15 Minuten gekocht. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie bei der Herstellung des normalen Kochsaftes (s. STOSSECK[24]).

Die durch Verdunstung verlorengegangene Flüssigkeitsmenge wurde durch Zugabe entsprechender Mengen aqua demin. ergänzt. Aus diesem Grunde wurden die Proben vor und nach dem Kochen gewogen. Parallel zum 1,9 %igen Perchlorsäuretrockenextrakt wurde so ein 1,9 %iger synchronisierter Trockenkochsaft gewonnen. Zur vorläufigen Charakterisierung dienten die Quotienten aus 250/260 = 0,879 und 280/260 = 0,459.

Der Gehalt an Trockensubstanz pro 1,0 ml betrug 19 mg (s. Tabelle 1).

d) Gewinnung des 1,8 %igen 3 mal gewaschenen Trockenkochsaftes (Extrakt D)

Zwecks Feststellung, ob es während des Zentrifugierens durch Verwerfen des Überstandes zu einem Verlust an sprossenbildenden Substanzen kommt, wurde auch Kochsaft geprüft, der aus 3 x gewaschenen Hefezellen hergestellt wurde. Die Gewinnung dieser Zellen erfolgte im Prinzip nach der von JACOBI[11] angegebenen Synchronisationsmethode. Die Hefe wurde 3 x bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Nach 3 x Zentrifugieren wurde die Hefe durch Membranfilter von der physiologischen Kochsalzlösung getrennt und 2,1 g davon abgewogen. Diese wurden in 10,0 ml aqua demin. suspendiert und gekocht. Weiterverarbeitung wie beim synchronisierten Kochsaft. Pro ml des so gewonnenen Kochsaftes wurden 18 mg Trockensubstanz erhalten. Er wurde daher als 3 x gewaschener 1,8 %iger Trockenkochsaft bezeichnet.

e) Gewinnung des 1,2 %igen nicht synchronisierten Trockenkochsaftes (Extrakt C)

Für die Gewinnung des 1,2 %igen nicht synchronisierten Trockenkochsaftes wurden 2,1 g der normalen käuflichen Bäckerhefe benutzt und wie bei der Herstellung des nicht synchronisierten 3,6 %igen Trockenkochsaftes verarbeitet. Da 1 ml des so gewonnenen Trockenkochsaftes im Durchschnitt 12 mg Trockensubstanz enthielt, wurde er als 1,2 %iger nicht synchronisierter Trockenkochsaft bezeichnet (s. Tabelle 1, Seite 6).

2. Keimversuche

a) Versuchsanordnung

Um vergleichbare Ausgangsbedingungen für die einzelnen Keimversuche zu erhalten, wurde eine Apparatur zusammengestellt, in der Hefesuspension unter annähernd standardisierten Bedingungen inkubiert werden konnte.

Ein Glasgefäß (d = 1 cm, l = 10 cm), das oben mit einem Schliffansatz verschlossen wurde, diente als Inkubationsraum.

b) Temperaturkonstanz

Den Inkubationsraum umgibt ein thermostatisch geregeltes Wasserbad, dessen Temperatur konstant auf 30° C eingestellt wurde.

c) Durchströmung mit Luft

Durch den Schliffansatz wurde ein nach unten zu einer Kapillare ausgezogenes Glasrohr bis auf den Boden des Inkubationsraumes geführt. Durch dieses Rohr wurde die Hefesuspension mittels einer Membranpumpe mit Luft in feiner Verteilung durchperlt. Die Luft wurde vorher durch eine Waschflasche geleitet. Dadurch wurde eine Wasserdampfsättigung bei Versuchstemperatur erreicht. Gleichzeitig wurde ein aerobes Milieu und eine gleichmäßige Verteilung der suspendierten Zellen geschaffen. Zum Entweichen diente ein zweites Glasrohr im Schliffansatz, welches 30 cm lang war. Hierdurch wurde eine Verdunstung aus dem Keimgefäß weitgehend verhindert. Die Größe des Inkubationsraumes variierte je nach Versuchsansatz.

d) Nährmedium

Als Nährmilieu diente ein Ansatz von 3,3 ml einer 0,1 %igen Hefesuspension. Bei der Kontrolle setzte er sich zusammen aus:

3,0 ml aqua demin.
+ 0,3 ml konzentriertem Nährsalz + Glucose
+ 3,3 mg synchronisierter Hefe.

Bei den zu untersuchenden Proben wurde das Wasser durch entsprechende Mengen des zu untersuchenden Stoffgemisches ersetzt. Genaue Angaben der zugesetzten Mengen s. Ergebnisse.

In einigen Versuchen wurde auch mit Versuchsansätzen von 1;1; 4,4; 5,5 und 11,0 ml gearbeitet. Nährsalz und Glucose wurden dann konzentrationsgerecht zugesetzt. Die konzentrierte Nährsalzlösung war 10-fach konzentrierter als jene von WILLIAMSON[26].

3. Bestimmungsmethoden von Zellzahl, Sprossung, freien Nucleotiden, RNS und DNS nach Zusatz des 1,9 %igen Perchlorsäuretrockenextraktes und des 1,9 %igen synchronisierten Trockenkochsaftes

In einer Versuchsreihe, in der im Parallelversuch die Einwirkung von Perchlorsäuretrockenextrakt und synchronisiertem Trockenkochsaft auf die Zellzahl, Sprossung, freien Nucleotide, RNS und DNS geprüft wurde, wurden folgende Bestimmungsmethoden angewandt.

a) Zellzahl und Sprossung

Die Zählung der Sprossen und der Zellzahl und das Einteilungsprinzip von Zellzahl und Sprosse wurden den Arbeiten von JACOBI[11] und WEGNER[25] entnommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wieder mit dem Celloscope (s. ARNOLD[1]).

b) Herstellung und Bestimmung der freien Nucleotide

Die Herstellung des Nucleotidextraktes erfolgte in dieser Versuchsreihe aus technischen Gründen nach der Methode von STOSSECK[24]. Als Gesamtansatz dienten 198 ml einer 0,5 %igen Hefesuspension.
Er bestand aus: 60 ml Extrakt
120 ml aqua demin.
18 ml konzentriertem Nährsalz
990 mg Hefe

Die Belüftungsphase erfolgte wie im Keimversuch S.11 beschrieben.

Für die Bestimmungen wurden zu Beginn, nach 2 1/2, nach 5 und nach 10 Stunden jeweils 2 Proben zu je 20 ml dem Inkubationsraum entnommen und im Methanolbad bei - 50° C eingefroren, anschließend bei 10° C aufgetaut und

10 Minuten bei 3500 x g zentrifugiert (bei + 2° C). Nach Dekantieren des Überstandes erfolgte die Zugabe von 5 ml kalter Perchlorsäure (+ 2° C) und 30 Minuten Extraktion auf dem Magnetrührer. Durch Zentrifugieren bei 3500 x g erfolgte dann die Trennung des Extraktes von den Hefezellen. Weiterverarbeitung des Überstandes zur Bestimmung der freien Nucleotide s. Extraktherstellung S. 7. Das Sediment wurde zur Bestimmung der RNS und DNS benutzt. Zur Entfettung wurde es zunächst mit 5 ml Äther-Alkohol im Verhältnis 1 : 3 versetzt und 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Hefe durch Zentrifugieren bei 3500 x g vom Überstand getrennt. Dieser wurde dann verworfen.

Nach Zugabe von 2 ml 6 %iger Perchlorsäure zu der Hefe wurde die Suspension für 15 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt, anschließend bis auf 20° C abgekühlt. Nach Trennung des Extraktes von den Hefezellen durch Zentrifugieren bei 3500 x g bei 2° C erfolgte im Parallelversuch die Bestimmung von RNS und DNS.

c) RNS - Bestimmung

Die Bestimmung der RNS erfolgte in diesem Falle nach BARRENSHEEN und PEHAM[2]. Als Versuchsansatz diente:

0,2 ml Extrakt
+ 1,8 ml aqua demin.
+ 2,0 ml Orzinreagenz

Dieser Versuchsansatz wurde 10 Minuten in ein kochendes Wasserbad gegeben, anschließend abgekühlt und die Ext. bei 660 mμ gemessen.

d) DNS - Bestimmung

Die DNS - Bestimmung erfolgte nach DISCHE[8]. Als Versuchsansatz diente:

1 ml Extrakt
+ 2 ml Diphenylaminreagenz

Auch dieser Versuchsansatz wurde 10 Minuten in ein kochendes Wasserbad gegeben. Nach Abkühlen erfolgte die Messung der Ext. bei 600 mμ (Umrechnung auf RNS- und DNS-Gehalt/10^9 Zellen s. STOSSECK[24]).

4. Säulenchromatographische Trennung von Perchlorsäuretrockenextrakt und synchronisiertem Kochsaft

Eine säulenchromatographische Auftrennung des Perchlorsäureextraktes erschien aus mehreren Gründen interessant; vorzüglich, weil es mit dieser Methode leicht möglich ist, den Extrakt in eine wässerige und säurelösliche Fraktion aufzutrennen.

Die Untersuchung der wässerigen Vorfraktion im Keimversuch erschien besonders wegen ihres von STOSSECK[24] nachgewiesenen Gehaltes an Basen, Nucleosiden und an Aminosäuren lohnend.

Das Hauptinteresse konzentrierte sich jedoch auf die freie Nucleotide enthaltende säurelösliche Fraktion, weil zu vermuten war, durch ihre Untersuchung einen definierten Schritt im Ablauf der Sprossung erfassen zu können.

a) Apparatur zur Säulenchromatographie (kleine Säule)

Die Apparatur zur chromatographischen Trennung der Extrakte wurde in modifizierter Form den Arbeiten von HURLBERT[10] und STOSSECK[24] entnommen.

Ein vertikal fixierter Polyäthylenschlauch mit einem Durchmesser von 9 mm und einer Länge von 126 cm wurde mit einem stark basischen Austauscherharz DOWEX 1 x 8, mesh 200 - 400, Gegenion $HCOO^-$ (Fa.: SERVA) beschickt.

Nach Auftragen des Extraktes auf die 126 cm lange Säule wurde diese mit 200 - 300 ml aqua demin. durchspült, um die Verbindungen, die nicht durch Ionenaustausch an die Säule festgehalten wurden, zu eluieren und aufzufangen. Zur Entfernung der restlichen CO_2-Spuren wurde das Wasser vorher gekocht.

Die in den Wassereluaten enthaltenen Verbindungen sind hinsichtlich ihrer Ladungen entweder neutral, oder ihre positiven und negativen Ladungen heben sich gegenseitig auf, wie das z.B. beim Glycerylphosphorcholin (GPC) und beim Glycerylphosphoryläthanolamin (GPA) der Fall ist (SCHIMASSECK[19]).

Die Auftrennung in 4 wässerige Vorfraktionen durch STOSSECK[24] und unsere eigene Auftrennung in 6 Fraktionen zeigen, daß diese Substanzen durch wahrscheinlich unterschiedliche Adsorptions- und Adhäsionskräfte in dem dreidimensionalen Maschenwerk des Anionenaustauscherharz festgehalten werden.

Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 10 - 11 ml/h bei der 126 cm langen Säule (Ø = 9 mm) und 80 - 90 ml/h bei der 156 cm langen Säule (Ø =3 cm) ist eine reproduzierbare Auftrennung in 6 Fraktionen möglich (s. Abb.1).

Die an die Säule durch echten Ionenaustausch zurückgehaltenen Verbindungen wurden mit einem Ameisensäure-Ammoniumformiatpuffer eluiert. Um bei der Elution einen kontinuierlichen Anstieg des Gradienten zu erreichen, wurde dieser mittels einer Fingerpumpe (Fa.: BÜHLER, Tübingen) aus der Reservoirflasche in eine mit 250 ml aqua demin. versehene Mischflasche mit automatischem Rührwerk gesaugt und dann über einen PVC-Schlauch von 1 mm Ø auf die Säule gepumpt. Als Puffer wurde zur Elution von Fraktion N I - IX (s. Abb.1) eine 4,05 m Ameisensäure- und eine 0,45 m Ammoniumformiatlösung benutzt. Für die restlichen Fraktionen N X - XVI eine 8,1 m Ameisensäure- und 0,9 m Ammoniumformiatlösung.

Durch Elution mit dem schwachen Puffer zu Beginn wurde ein langsameres Ansteigen des pH-Wertes und damit eine bessere Trennung der Fraktionen erreicht. Auf die 126 cm lange Säule wurden bis zu 570 mg des 1,9 %igen Perchlorsäuretrockenextraktes aufgetragen. Gebrauchte Puffermenge: 650 - 700 ml.

Durch Zwischenschaltung eines pH-Meters mit Durchflußelektrode zwischen Küvette und Auffanggefäß wurde in drei Versuchen der pH-Wert bestimmt, bei dem die einzelnen "peaks" eluiert wurden (s. Abb.1).

Es wurde regelmäßig ein Anstieg der pH-Wertes zur sauren Seite beobachtet, der nach Elution der Fraktion wieder abfiel. Diese Beobachtung spricht für eine Protonierung während der Elution der einzelnen "peaks". Während des gesamten Versuchsverlaufs fiel der pH-Wert von 6,5 auf 2,6 ab. Nähere Einzelheiten über die Gradientenelution und Berechnung der Konzentration der Puffer im Mischgefäß s. GEISS[9)].

Unter Berücksichtigung der Größe des Austauscherbettes kann der Anstieg der Säurekonzentration durch Änderung des Volumens der Mischflasche variiert werden.

Je nachdem inwieweit Wert auf eine exakte Auftrennung des Perchlorsäuretrockenextraktes gelegt wurde, wurde das Volumen der Mischflasche verändert.

Ausführliche Darstellungen der angewandten Form der Austauschchromatographie siehe unter: COHN[4,5,6)], HURLBERT[10)], SCHMITZ[22)], SCHNITGER[23)].

Die eluierten Substanzen gelangten über einen PVC-Schlauch von 1 mm Ø in eine Durchflußküvette von 1 cm Schichtlänge. Die Extinktionsänderung wurde im ZEISS PMQ II bei 260 mu gemessen und mit einem METRAWATT-SERVOGOR-Schreiber linear aufgezeichnet. Die Fraktionen wurden entweder einzeln durch im Eisbad stehende Flaschen oder mit einem automatischen Fraktionssammler (LKB-Radic-Rac) in 3,7 ml bei der 126 cm langen und in 30 ml Fraktionen bei der 156 cm langen Säule aufgefangen.

b) Apparatur zur Säulenchromatographie (große Säule)

Zur Auftrennung großer Mengen an Perchlorsäuretrockenextrakt wurde eine große Säule von 156 cm Länge (s.Abb.1) benutzt. Entsprechend dem ca. 10-fachen Volumen der Säule enthielt das Mischgefäß 2,5 l aqua demin. Das

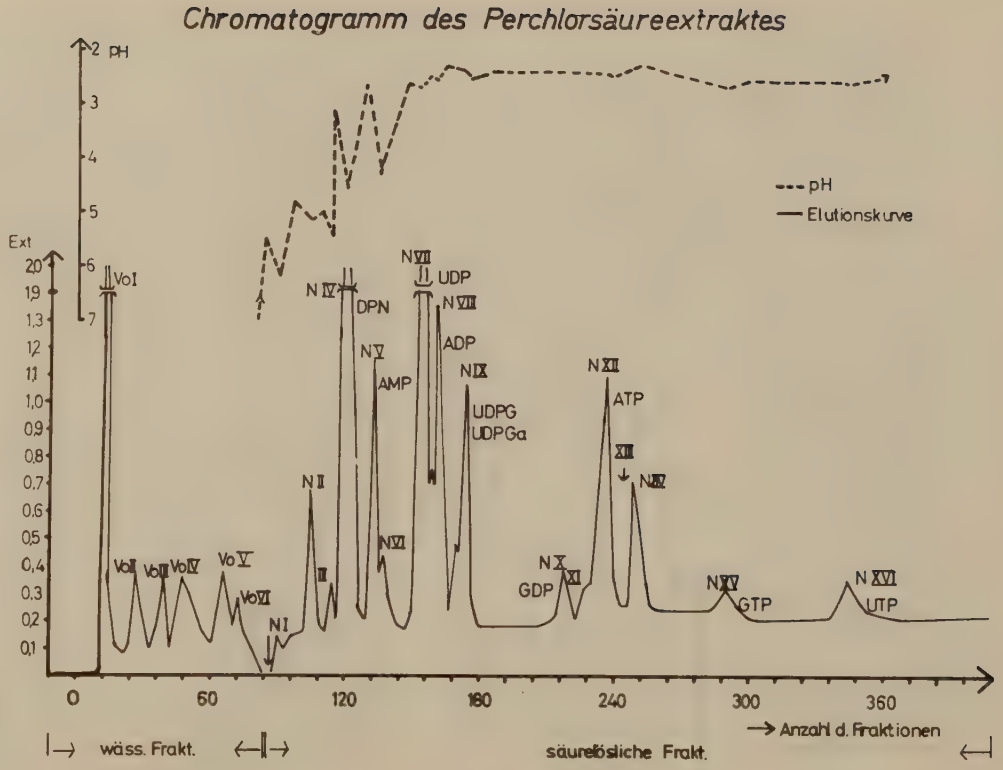
Durchflußvolumen wurde ebenfalls auf 80 - 90 ml/h erhöht. Auf diese Säule wurden bis 5130 mg des 1,9 %igen Perchlorsäuretrockenextraktes aufgetragen (= 270 ml). Gebrauchte Puffermenge: 7,5 l.

c) Regeneration und Füllung der Säule

Die Regeneration der 126 cm langen (Ø = 9 mm) Säule erfolgte zunächst mit 170ml 1 n HCl, anschließend Neutralisation mit aqua demin. bis pH 7,0, d.h. bis keine Cl^--Ionen mehr mit $AgNO_3$ nachweisbar waren. Dann erneutes Waschen mit 170 ml 1 n NaOH und Neutralisieren mit aqua demin. Zum Schluß wurde die Säule mit 170 ml 1 n HCOOH in die Formiatform gebracht. Der Überschuß an Ameisensäure wurde mit aqua demin. herausgespült. Für die große Säule wurde jeweils die 8 - 10-fache Menge benutzt. Um Zeit zu sparen, empfiehlt es sich, die Regeneration außerhalb des Polyäthylenschlauches vorzunehmen.

Zur Füllung der Säule wurde das DOWEX nach Regeneration in aqua demin. aufgeschlämmt und mittels einer Fingerpumpe auf die Säule gepumpt.

Die Auftrennung des Perchlorsäuretrockenextraktes und des synchronisierten Trockenkochsaftes mit der oben ausgeführten Methode der Säulenchromatographie ergab je nach Durchflußvolumen / Zeit und je nach Anstieg des Gradienten eine Fraktionierung der wässerigen Vorfraktion in 2 - 6 peaks, der säurelöslichen Fraktion in 10 - 16 peaks (s. Abb.1, 5 und 6).


Chromatogramm des Perchlorsäureextraktes
pH
Ext
---pH
—Elutionskurve
VoI
NIV
DPN
NVII
UDP
NVIII
ADP
NV
AMP
NIX
UDPG
UDPGa
NII
NVI
NI
NXII
ATP
XIII
NXIV
NX
GDP
XI
NXV
GTP
NXVI
UTP
VoII
VoIII
VoIV
VoV
VoVI
0
60
120
180
240
300
360
Anzahl d. Fraktionen
wäss. Frakt.
säurelösliche Frakt.

A b b i l d u n g 1

Legende zu Abbildung 1

Chromatographie: Dowex 1 x 8, 200 - 400 mesh, Formiatform
Säule: 156 x 3 cm
Fraktion: 30 ml
Mischflasche: 2,5 l aqua demin.
Elution:

Fraktion: 1 - 84: aqua demin.
85 - 180: 4,05 m HCOOH
+ 0,45 m NH_4HCOO^-
181 - 360: 8,1 m HCOOH
+ 0,9 m NH_4HCOO^-

Gebrauchte Puffermenge: 7,5 l
Auftragsmenge: 5130 mg Perchlorsäuretrockenextrakt
(=270 ml Extrakt)

5. Weiterverarbeitung der Eluate nach Säulenchromatographie

a) Aufarbeitung der wässerigen Fraktionen

Die mit aqua demin. eluierten Substanzen wurden je nach der Menge, die für die Keimversuche oder für Schichtchromatographie gebraucht wurde, im Rotationsverdampfer eingeengt oder zur Gewinnung der Trockensubstanz bis zu 24 Stunden in die Gefriertrocknung gegeben. Die Dauer der Gefriertrocknung richtete sich nach der Flüssigkeitsmenge.

b) Aufarbeitung der säurelöslichen Fraktionen

Die mit Puffer eluierten Substanzen wurden je nach Keimversuch alle zusammen, in Gruppen oder einzeln zunächst zur Entfernung der Ameisensäure und des Wassers im Rotationsverdampfer bei 30 - 35° C eingeengt und dann zur Entfernung des Ammoniumformiats in die Gefriertrocknung gegeben. Die Dauer der Gefriertrocknung richtete sich auch hier nach der zu sublimierenden Puffermenge. Sie schwankte zwischen 18 und 48 Stunden.

Wie von HURLBERT und Mitarbeitern[10] beschrieben, wurde das Vakuumgefäß von der zweiten bis dritten Stunde

an mit einer Infrarotlampe bestrahlt. Auf diese Weise wurde eine weitgehende Sublimation des Ammoniumformiats erzielt. Eine solche Entfernung war aus zweierlei Gründen erforderlich:

Erstens hatten Versuche mit hohen Ammoniumformiatkonzentrationen einen hemmenden Effekt auf die Sprossenbildung gezeigt, zweitens wirkten sie wegen der hohen Eigenabsorption des Puffers im UV-Bereich störend auf die Messung des Spektrums. Durch die Bestrahlung stieg die Temperatur im Vakuumgefäß auf über 40° C an. Nach REIK[18] ist eine Temperatur von über 35 - 40° C Voraussetzung für eine Sublimation des Ammoniumformiats. Diese Beobachtung stimmt auch mit unserer eigenen überein, daß nämlich bei Zimmertemperatur praktisch keine Sublimation eintritt. Der positive Nachweis von Ammoniak mit Neßlers-Reagens zeigte jedoch, daß es selbst mit Infrarotbestrahlung nicht gelang, alles Ammoniumformiat aus dem Eluat zu entfernen.

Wahrscheinlich war die Temperatur im Vakuumgefäß noch zu niedrig. Von REIK[18] wurden Temperaturen bis 145° C angegeben. Eine Temperaturerhöhung im Vakuumgefäß auf diesen Wert konnte wegen der Hitzeempfindlichkeit der Fraktionen nicht gewagt werden.

Da Keimversuche mit Fraktionen, in denen die restlichen Spuren des Ammoniumformiats mit Hilfe eines Kationenaustauschers (s. KORANSKY[12]: DOWEX 50 x 8, mesh 20 - 50, l = 22 cm, Ø = 3 cm) und anschließender Gefriertrocknung vollständig entfernt werden konnten, keinen Unterschied aufwiesen zu jenen, in denen das Eluat nur einmal in die Gefriertrocknung gegeben wurde, genügte in diesen Versuchsreihen eine einmalige Gefriertrocknung.

Hierzu veranlaßte noch ein weiterer Grund: Messung der Extinktion vor und nach der Elution am Kationenaustauscher hatten nämlich niedrigere Werte nach der

Elution ergeben, was auf einen Verlust oder einen Umbau der Substanzen während des Elutionsvorganges schließen läßt. Ähnliche Beobachtungen wurden von STOSSECK[24] gemacht.

Einen fördernden Effekt durch geringe Konzentrationen an Ammoniumformiat bzw. der Ammonium-Ionen auf die Sprossenbildung war ebenfalls unwahrscheinlich, da in der Nährlösung Ammonium-Ionen im Überschuß vorhanden waren.

Um einen Kontakt der Ameisensäure mit der Vakuumpumpe zu vermeiden, wurde ein Trockenturm von 20 cm Länge und 7 cm Innendurchmesser, gefüllt mit NaOH-Plätzchen und grober Glaswolle, zwischen Pumpe und Vakuumgefäß geschaltet. Dabei mußte in Kauf genommen werden, daß das Vakuum um eine Zehnerpotenz geringer war, als bei der Leistung der Pumpe von 10^{-3} Torr möglich gewesen wäre. Nach der Gefriertrocknung wurden die Fraktionen in definierte Mengen aqua demin. gelöst und im Keimversuch eingesetzt oder als Trockensubstanz im Vakuum bis zum Gebrauch aufbewahrt.

6. Schichtchromatographie der säurelöslichen und wässerigen Fraktionen

Zur weiteren Auftrennung der säulenchromatographisch gewonnenen Fraktionen wurden Cellulose-Schicht-Platten hergestellt und mit einem eigens dafür entwickelten elektromechanischen Auftraggerät strichförmig aufgesprüht (s. Abb. 2).

a) Sprühgerät

Dieses besteht aus einem Schlitten, auf dem die Trägerplatten leicht geneigt stehen oder ein Papierbogen eingespannt ist. Der Schlitten bewegt sich mit völlig gleichmäßiger Geschwindigkeit vor einer oder mehreren Düsen hin und her. Das aufzutragende gelöste Stoffgemisch wird mit Hilfe eines regulierbaren Luftdruckes (0,01 Atü

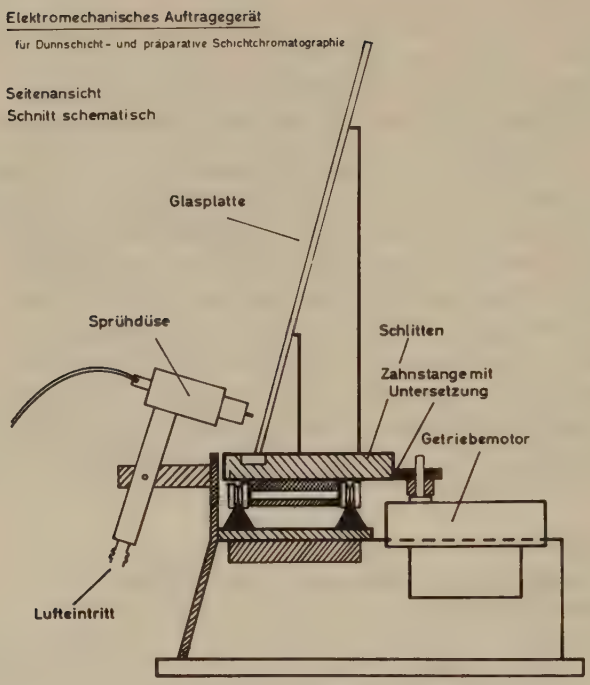

Elektromechanisches Auftragegerät
für Dünnschicht- und präparative Schichtchromatographie
Seitenansicht
Schnitt schematisch
Glasplatte
Sprühdüse
Schlitten
Zahnstange mit
Untersetzung
Getriebemotor
Lufteintritt

Abbildung 2

oder höheren Drucken) auf das Adsorbens aufgesprüht. Das aufzutragende Volumen befindet sich in einer Glasinjektionsspritze, die auf der Gabel einer Infusionsmaschine liegt. Diese drückt den Stempel der Injektionsspritze nach innen. Durch die Wahl der Übersetzung im Stufengetriebe der Infusionsmaschine und durch die Größe der Injektionsmaschine ist es bis zu einem gewissen Grade möglich, jedes beliebige Volumen pro Zeiteinheit aufzusprühen. Die optimale Leistung lag hier bei 0,5 ml/h. Benutzt wurde eine 1 ml Tuberkulinspritze. Um ein Feuchtwerden und damit ein Ausbreiten der Startlinie zu verhindern, wurde außerdem ein Ventilator in 20cm Höhe über der Platte angebracht.

b) Adsorptionsmittel

Als Adsorptionsmittel wurde für Schichtchromatographie MN-300-Cellulos (Fa.: MACHEREY und NAGEL) benutzt. Die Cellulose-Schicht-Platten wurden wie folgt hergestellt:

Pro Platte wurden 8 g Cellulose in 50 ml Wasser aufgeschlämmt, mit einem Ultrathurax gleichmäßig suspendiert und mit der Hand aufgetragen. Die Maße der Platten betrugen: 20 x 20 cm.

Für Dünnschichtchromatographie benutzten wir ECTEOLA-Cellulose (TLC SERVA).

1 g ECTEOLA-Cellulose + 4 g MN-300-Cellulose
+45 ml Wasser.

Diese Suspension reichte für sechs Platten mit den Maßen 10 x 15 cm.

c) Fließmittel

Zur Trennung der wasserlöslichen Fraktionen wurden folgende zwei Fließmittel benutzt:

1) nach RANDERATH[16]:

0,15 m NaCl — Laufzeit: 15 Minuten

2) nach WYATT[27]:

Isopropanol	170 ml	Laufzeit: 8 - 9 Stunden
konzentriertes HCl	41 ml	
Wasser	39 ml	

Für die weitere Fraktionierung der säurelöslichen Fraktionen wurden folgende drei Fließmittel benutzt:

1) nach RANDERATH und STUCK[17]:

n-Butanol	7	Laufzeit: 8 - 9 Stunden
Aceton	5	
Eisessig	3	
5 %ige Ammoniaklösung	3	
Wasser	2	

2) nach MICHELSON[14] und RANDERATH[15]:

Amylenhydrat	3	Laufzeit: 6 - 7 Stunden
konzentrierte Ameisensäure	2	
Wasser	1	

3) nach RANDERATH[16]:

0,15 m NaCl

Nach Herausnahme aus der Fließkammer wurden die Platten zunächst über Nacht getrocknet und anschließend im UV-Licht bei 254 mμ betrachtet. Die einzelnen Banden wurden dann herausgekratzt und mit Wasser eluiert. Anschließend erfolgte die Trennung des Eluates von der Cellulose durch 2 x 30 Minuten Zentrifugieren bei 3500 x g. Von den eingeengten Banden wurden dann Proben für UV-Spektren und für Keimversuche entnommen.

II. Ergebnisse

1. Wirkung der Extrakte auf die Sprossung

Ein quantitativ angestellter Vergleich der im methodischen Abschnitt unter 1 a) - e) (S. 5 - 10) beschriebenen Extrakte zeigt, daß im Perchlorsäuretrockenextrakt (Extrakt A), im synchronisierten Trockenkochsaft (Extrakt E) und im dreimal gewaschenen Trockenkochsaft (Extrakt D) etwa gleiche Mengen an Trockensubstanz pro ml des hergestellten Extraktes enthalten sind. Dagegen enthielt, entsprechend der etwa dreifachen Menge an Ausgangshefe, der 3,6 %ige nicht synchronisierte Trockenkochsaft (Extrakt B) die dreifache Menge an Trockensubstanz im Gegensatz zum 1,2 %igen nicht synchronisierten Trockenkochsaft (Extrakt C).

In diesem Abschnitt sollte nun die Wirkung dieser Extrakte auf die Sprossung geprüft und, soweit möglich, qualitativ miteinander verglichen werden.

Durch Vergleich des Extraktes A mit dem im Parallelversuch hergestellten Extrakt E sollten die zwei grundsätzlich verschiedenen Extraktionsmethoden hinsichtlich ihres Gehaltes an sprossungsbeeinflussenden Substanzen untersucht werden. Ferner sollte durch Vergleich der Kochsäfte verschiedener Zubereitung ermittelt werden, ob es durch Verwerfen des Überstandes während des fraktionierten Zentrifugierens zu einem Verlust an aktivierenden Substanzen kommt.

Versuche mit einem Kochsaftextrakt, der aus diesem Überstand, bestehend aus kleinen Zellen und Bakterien (s. Diss. STOSSECK, Marburg 1966), hergestellt wurde, hatten eine Wirkung auf die Sprossung ergeben.

Weiter sollte durch diesen Vergleich die Abhängigkeit der Sprossung von der Konzentration der Ausgangshefe (Frischhefe) für die Kochsaftzubereitung untersucht werden.

Da aufgrund der verschiedenen Extraktionsmethoden der Gehalt an Milligramm Trockensubstanz pro Milliliter des hergestellten Extraktes unterschiedlich war, erschien es günstig, die Wirkung der einzelnen Extrakte in Milligramm Trockensubstanz pro Milliliter Keimansatz als gemeinsames Maß zu prüfen. Auf diese Weise wurden die Endkonzentrationen miteinander verglichen.

Versuche von JACOBI[11)] hatten ergeben, daß durch Auszählen von 100 Zellen eines Kulturansatzes ein für die Gesamtkultur repräsentativer Querschnitt gewonnen werden kann. In diesen Versuchen wurden daher ebenfalls jeweils 100 Zellen pro Probe gezählt und der Prozentgehalt an gesproßten Zellen notiert. Bei Sprossung aller 100 Zellen lag eine 100 %ige Sprossung vor.

Als Einzelindividuum wurden Mutterzelle und gesproßte Zelle auch dann noch angesehen, wenn die gesproßte Zelle bereits durch eine eigene Zellmembran von der Mutterzelle abgesetzt war, beide Zellen jedoch noch zusammenhafteten.

Die beschriebenen Extrakte wurden in folgenden Endkonzentrationen, bezogen auf Milligramm Trockensubstanz pro Milliliter Keimansatz, geprüft:

6 mg Extrakt A (Perchlorsäuretrockenextrakt)
3,3 mg Extrakt B (3,6 %iger nicht synchronisierter Trockenkochsaft)
3,6 mg Extrakt C (1,2 %iger nicht synchronisierter Trockenkochsaft)
5,4 mg Extrakt D (dreimal gewaschener Trockenkochsaft)
6 mg Extrakt E (synchronisierter Trockenkochsaft)

Um die Abhängigkeit der Sprossung von der Konzentration der zugesetzten Extrakte zu prüfen, wurde einerseits der Extrakt A und andererseits der Extrakt E in verschiedenen Konzentrationen im Keimversuch untersucht.

Zunächst wurde die Wirkung des Extraktes A auf die Sprossung ermittelt.

a) Wirkung des Extraktes A (Perchlorsäuretrockenextrakt)

In dieser Versuchsreihe wurde der Extrakt A in folgenden Endkonzentrationen im Keimversuch geprüft: 18, 6, 2 und 0,6 Milligramm Trockensubstanz pro Milliliter Ansatz.

Bei Zusatz von 6 mg/ml (0,6 %) Ansatz zeigte sich in den ersten 60 Minuten keine Sprossung. Zwischen der 60. und 90. Minute stieg die Sprossung von 13 auf 27 % an, nach drei Stunden erreichte sie ihr Maximum von 85 %. Bis zur fünften Stunde wurde dieser Sprossungszustand beibehalten, bis zur achten Stunde kam es zu einer Abstoßung der Sprossen bis auf 74 % (± 3,66) (Abb.3 und Tabelle 6).

Im Vergleich dazu lag die Sprossung bei den Kontrollwerten im Durchschnitt nach drei Stunden noch bei 13 %, nach fünf Stunden bei 16 %. Zu einer sichtbaren Zunahme kam es in der sechsten Stunde. Nach acht Stunden lag die Sprossung bei 39 % (Abb.3 und Tabelle 12).

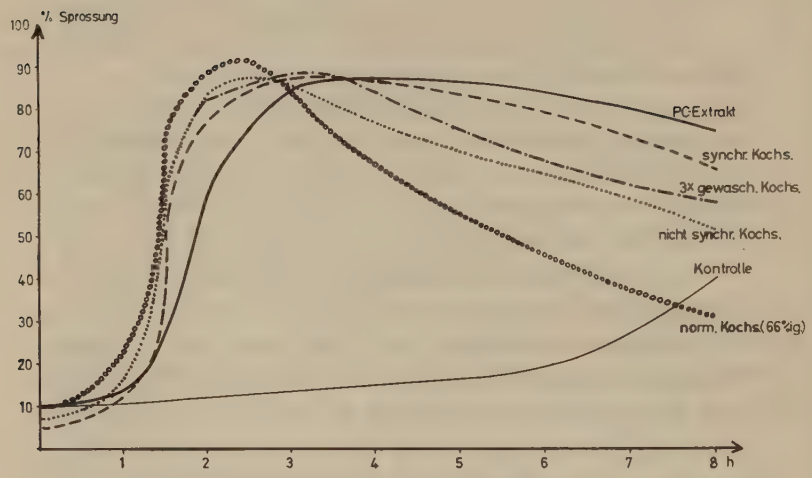
Wie aus der Abb.3 und der Tabelle 7 hervorgeht, zeigt sich bei Zusatz der dreifachen Menge an Extrakt A (18 mg/ml) eine beschleunigte Sprossung. Nach 2 1/2 Stunden wurde das Sprossungsmaximum von 88 % erreicht. Auffallend war, daß die Sprossen bereits in der fünften Stunde abgestoßen wurden. Nach acht Stunden lagen die Werte bei 63 % (im Gegensatz dazu bei 74 % nach Zusatz von 6 mg Extrakt A).

Eine nochmalige Verdreifachung der zugegebenen Extraktmenge konnte keine weitere Beschleunigung der Sprossung bewirken.

Versuche mit Zusatz von 2 Milligramm Extrakt A (0,2 %) ergaben eine schleppende Zunahme der Sprossung. Nach acht Stunden waren 68 % der Zellen gesproßt.

Versuche mit einer 0,06 %igen Konzentration (0,6 mg/ml) zeigten keine nennenswerte Wirkung mehr (Abb.4 und Tabelle 7).

Sprossungsverlauf bei Zusatz verschiedener Hefeextrakte



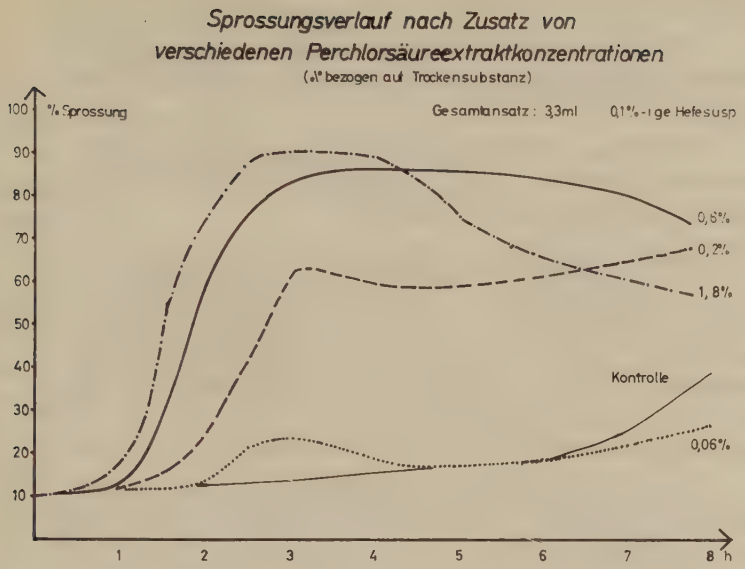
A b b i l d u n g 3

Beeinflussung der Sprossung durch verschiedene Extrakte

6 mg	PC-Extrakt	=	0,6 % Extrakt A
3,3 mg	Kochsaft (66 %)	=	0,33 % Extrakt B
3,6 mg	nicht synchronis. Kochsaft	=	0,36 % Extrakt C
5,4 mg	3x gewaschener Kochsaft	=	0,54 % Extrakt D
6 mg	synchronisierter Kochsaft	=	0,6 % Extrakt E

(% = Endkonzentration)

mg bezogen auf Trockensubstanz / ml Ansatz



A b b i l d u n g 4

Beeinflussung der Sprossung durch Zusatz verschiedener Konzentrationen des Extraktes A

(Perchlorsäureextrakt)

(% = Endkonzentration)

b) Beeinflussung der Sprossung durch Kochsäfte verschiedener Zubereitung

Zunächst wurde der Extrakt B (3,6 %iger nicht synchronisierter Trockenkochsaft) auf seine sprossungsanregende Wirkung geprüft.

Von diesem Extrakt B wurden folgende Mengen dem Keimansatz zugesetzt: 29, 9,8, 3,3, 0,98 und 0,33 Milligramm pro Milliliter Ansatz.

Wie aus der Abb.3 und der Tabelle 8 hervorgeht, hatten nach Zusatz von 3,3 Milligramm dieses Extraktes (0,33 %) zwischen der 30. und 60. Minute 23 % Zellen Sprossen gebildet. Nach 2 1/2 Stunden wurde das Sprossungsmaximum mit 91 % erreicht. Interessanterweise kam es zu einer sofortigen Abstoßung der Tochterzellen. Nach acht Stunden wurden noch 30 % sprossende Zellen gezählt.

Durch Erhöhen der Konzentration um das Drei- bis Neunfache (9,8 bzw. 29 mg / ml Ansatz) konnte keine merkliche Beschleunigung der Sprossung erzielt werden. Auch die Abstoßung der Sprossen konnte nicht beschleunigt werden.

Eine Konzentrationsverringerung auf ein Drittel (0,98 mg / ml Ansatz) ergab, wie aus Tabelle 8 ersichtlich ist, einen schleppenden Anstieg der Sprossung von 13 auf 48 % zwischen der ersten halben Stunde und der zweiten Stunde. Nach vier Stunden wurde das Maximum mit 60 % erreicht. Zusatz einer zehnfach kleineren Menge (0,33 mg / ml Ansatz) zeigte nur noch eine sehr schwache Wirksamkeit. Nach zwei Stunden wurde das Maximum von 32 % erreicht.

Die Prüfung der unter 1 C - E (S.26) aufgeführten Extrakte ergab einen ähnlichen Verlauf der Sprossung hinsichtlich des Anstiegs und des Abfalls der Sprossungskurve wie bei Zusatz von 3,3 mg Extrakt B. Das Sprossungsmaximum wurde bei allen drei Proben im Durchschnitt nach 2 1/2 Stunden mit 85 % erreicht (Abb.3 und Tabelle 9 - 11). Anschließend kam es auch hier zu einem

sofortigen Abstoßen der Sprossen, jedoch nicht so stark wie bei Zusatz von Extrakt B.

Am deutlichsten war die Abstoßung bei Zusatz von Extrakt C. Nach acht Stunden lag der Mittelwert aus drei Versuchen bei 51 % (± 12,25).

Vergleichsweise lagen beim Extrakt D die acht Stundenwerte bei 57 % (± 6,95), beim Extrakt E 65 % (± 5,94).

Die Versuche mit den verschiedenen Extrakten zeigen, daß die Sprossung wahrscheinlich in zwei Phasen verläuft, für die jeweils ein anderer Faktor notwendig ist, und zwar ein Faktor, der die Sprossenbildung anregt und ein Faktor, der die Sprossenabstoßung bewirkt.

Aus dem Vergleich der Versuchsergebnisse von Kochsaft- und Perchlorsäureextrakten hinsichtlich der Ausbeute an diesen Faktoren geht ein sichtbar höherer Gehalt dieser sprossungsaktivierenden und -abstoßenden Substanzen in den Kochsäften hervor. Er liegt am höchsten in den beiden Kochsaftextrakten B und C.

Aufgrund dieser Versuche muß man annehmen, daß es durch Verwerfen des Überstandes beim Zentrifugieren zu einem Verlust beider Faktoren kommt. Hierfür spricht auch, daß sich beim Extrakt E und Extrakt A, die beide aus synchronisierten Zellen hergestellt wurden, in ihrer Wirkung auf die Sprossung kaum unterscheiden.

3,3 Milligramm Trockensubstanz des Extraktes B entsprechen der sprossungsfördernden Wirkung von etwa 12 - 18 Milligramm des Extraktes A.

Über den Gehalt an Faktoren, die die Abstoßung der Sprossen bewirken, läßt sich beim Perchlorsäureextrakt keine klare Aussage machen. Einer der Gründe hierfür ist, daß es selbst bei hohen Konzentrationen an Extrakt A (Perchlorsäureextrakt) im Vergleich zu den Kochsäften erst relativ spät (nach vier Stunden) und langsam zu einer Abstoßung der Sprossen kommt. Nach acht Stunden

lagen die Werte noch bei 63 %. Eine Beobachtung der Sprossung über acht Stunden hinaus ließ keine klaren Aussagen mehr zu, da die Zellen sich inzwischen zu Ketten und Haufen aneinander gelagert hatten, so daß ein Auszählen der Einzelzellen nicht mehr möglich war.

Die späte und langsame Abstoßung der Sprossen läßt jedenfalls auf einen sehr geringen Gehalt an sprossenabstoßenden Faktoren im Perchlorsäureextrakt schließen. Hier entsprechen 18 Milligramm des Perchlorsäureextraktes der Wirkung von 6 Milligramm des synchronisierten Trockenkochsaftes (Extrakt E).

c) Simultanvergleich von Perchlorsäureextrakt (Extrakt A) und Kochsaft (Extrakt E) aus synchronisierter Hefe mit Bestimmung von Zellzahl, Sprossung, RNS, DNS und freien Nucleotiden

Um zu prüfen, ob Extrakt A und Extrakt E eine unterschiedliche Wirkung auf den Stoffwechsel dieser beiden Sprossungsphasen zeigen, wurden in einem Parallelversuch Sprossung, Zellzahl, RNS, DNS und freie Nucleotide bestimmt (Tabelle 13).

Der Gesamtansatz betrug: 198 ml 0,5 %ige Hefesuspension.

In diesem Versuch verlief die Sprossung wie in den vorangegangenen Untersuchungen. Die Zellzählung ergab beim Extrakt E bis zur achten Stunde einen Anstieg von $5{,}8 \times 10^4$ auf $7{,}4 \times 10^4$, bis zur zehnten Stunde einen Anstieg auf 1×10^5 Zellen / mm^3 Ansatz. Beim Extrakt A und bei der Kontrolle lagen die Werte nach acht Stunden noch in Höhe des Ausgangswertes. Zwischen der achten und zehnten Stunde kam es hier zu einem Anstieg von $5{,}8 \times 10^4$ auf $6{,}9 \times 10^4$ Zellen / mm^3 Ansatz.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß es parallel mit der Abstoßung der Zellen zu einer Zunahme der Zellzahl kommt.

Aus der Bestimmung der Extinktion der freien Gesamtnucleotide in den ersten acht Stunden ergab sich beim Extrakt A ein Anstieg der Extinktion von 0,155 auf 1,06, also um rund das Siebenfache (Tabelle 13). Im gleichen Zeitraum stieg die Nucleotidkonzentration beim Extrakt E um das Dreieinhalbfache an, nämlich von Ext.= 0,286, die Kontrollwerte von Ext.= 0,118 auf 0,446. Auffallend war die hohe Anfangskonzentration bei Extrakt E. Eine Begründung konnte nicht gefunden werden.

Nach der achten Stunde kam es bei beiden Extrakten zu einem Abfall der Nucleotidkonzentration, beim Extrakt A auf Ext.= 0,809, beim Extrakt E auf Ext.= 0,810 bis zur zehnten Stunde. Bei der Kontrolle stiegen die Werte in dieser Zeit weiter auf Ext.= 0,500 an.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß zunächst eine gewisse Nucleotidkonzentration erreicht sein muß, die in Anstieg und Abfall in zeitlichem Zusammenhang zur Sprossenbildung und zum Sprossenabwurf steht.

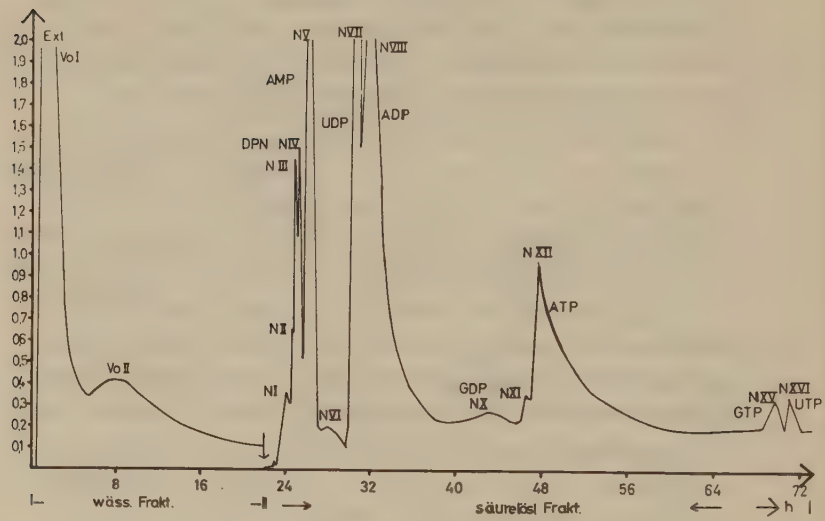
Die RNS-Konzentrationen stiegen in dem genannten Zeitraum in beiden Extrakten um etwa 40 %, die DNS-Konzentrationen um 85 % an (Tabelle 13).

2. Beeinflussung der Sprossung durch säulenchromatographisch aufgetrennte Fraktionen

a) Vergleich der Elutionskurve von Extrakt E mit Extrakt A (Abb.5 und 6)

Obwohl der Gehalt an sprossungsfördernden und sprossenabstoßenden Faktoren in den Extrakten aus nicht synchronisierter Hefe höher lag als in den Extrakten aus synchronisierten Hefezellen, wurden zur weiteren Fraktionierung der Perchlorsäureextrakt und der synchronisierte Kochsaft gewählt, da es sich bei diesen Extrakten um reine Zellextrakte handelt. Beim Vergleich des Säulenchromatogramms des Extraktes E mit dem des Extraktes A zeigt sich eine deutlich höhere Konzentration der wässerigen Vorfraktion des Extraktes E, gemessen an der Peak-Fläche, gegenüber jener des Extraktes A.

Chromatogramm des Kochsaftextraktes

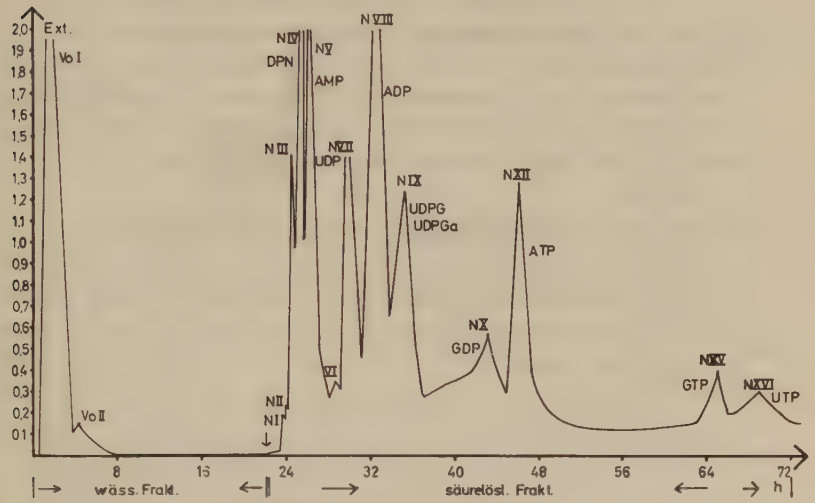


A b b i l d u n g 5

Säulenchromatogramm des synchronisierten Kochsaftes
(Extrakt E)

Chromatographie:	Dowex 1 x 8, mesh 200 - 400, Formiatform
Säule:	l = 55 cm, Ø = 5 mm
Mischgefäß:	250 ml
Elution:	1 - 22 Stunden Wasser 23 - 72 Stunden 8,1 m HCOOH + 0,9 m NH_4HCOO^-
Auftragsmenge:	10 ml Extrakt E
Gebrauchte Puffermenge:	800 ml

Chromatogramm des Perchlorsäureextraktes



A b b i l d u n g 6

Säulenchromatogramm des Perchlorsäureextraktes

(Extrakt A)

Chromatographie:	Dowex 1 x 8, mesh 200 - 400, Formiatform
Säule:	1 = 55 cm, Ø 5 mm
Mischgefäß:	250 ml
Elution:	1 - 22 Stunden Wasser 23 - 72 Stunden 8,1 m HCOOH + 0,9 m NH_4HCOO^-
Auftragsmenge:	10 ml Extrakt A
Gebrauchte Puffermenge:	800 ml

Im Gegensatz dazu scheint der Gehalt an säurelöslicher Fraktion und damit an freien Nucleotiden im Extrakt A höher zu sein. Bemerkenswert war beim Extrakt E das Fehlen der später vermehrungsaktiv gefundenen N IX-Fraktion und die kleineren peaks im Bereich der Triphosphate.

Da vermutet wurde, daß Nucleotide in die biochemischen Vorgänge während der Zellsprossung eingreifen, wurde in den folgenden Versuchen hauptsächlich auf eine Auftrennung des Perchlorsäureextraktes Wert gelegt. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen im Keimversuch auf ihre vermehrungsanregende Wirkung geprüft.

b) Beeinflussung der Sprossung durch das Gesamteluat

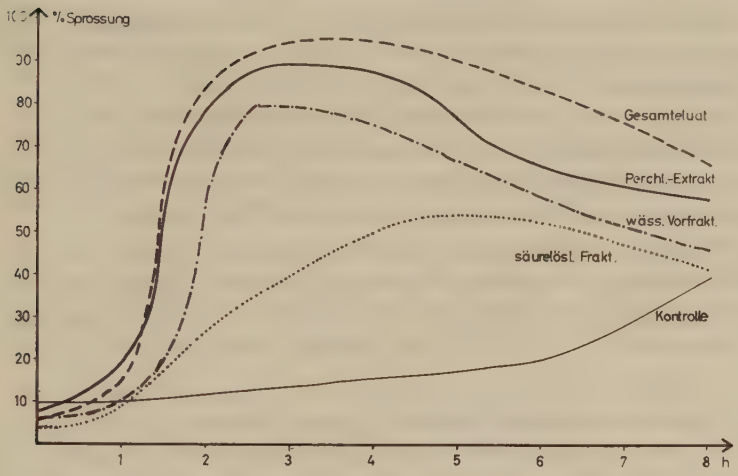
Die sprossenanregende Wirkung des Gesamteluates wurde in einem Gesamtansatz von 11 ml geprüft. Auf die Säule waren 10 ml des Extraktes A (Perchlorsäureextrakt) aufgetragen worden.

Nach Auftrennung durch Säulenchromatographie an einen stark basischen Anionenaustauscher (DOWEX 1 x 8) wurde die wässerige Fraktion und die gefriergetrocknete säurelösliche Fraktion in 10 ml aqua demin. gelöst und als Gesamteluat im Keimversuch eingesetzt. Mit diesem Versuch sollte geprüft werden, ob es während der Aufarbeitung des Eluates zu einem Verlust an vermehrungsanregenden Substanzen kommt.

Ausgehend von der Annahme, daß das Eluat während der Aufarbeitung nichts an sprossungsaktivierenden Substanzen durch Ab- oder Umbau verliert, entspricht diese Eluatmenge dem Ansatz der Konzentration von 18 Milligramm Extrakt A pro Milliliter Ansatz.

Beim Gesamteluat kam es zwischen der 60. und 90. Minute zu einer Zunahme der Sprossung von 13 % auf 61 %. Nach 2 1/2 Stunden wurde das Maximum mit 94 % erreicht (Abb.7 und Tabelle 14). Wie beim Extrakt A blieb die Sprossung bis zur fünften Stunde praktisch konstant bei diesem Wert, anschließend kam es dann bis zur achten

Sprossungsverlauf nach Zusatz verschiedener Eluate nach Säulenchromatographie



A b b i l d u n g 7

Beeinflussung der Sprossung durch säulenchromatographisch aufgetrennte Fraktionen

Gesamtansatz: 11 ml 0,5 %ige Hefesuspension

Zugesetzte Eluatmenge: 10 ml

(Die einzelnen Fraktionen wurden nach Elution jeweils auf 10 ml eingeengt.)

Perchl.-Extrakt: 190 mg / 11 ml Ansatz
(18 mg / ml Ansatz = 1,8 %)

Stunde zu einer Abstoßung der Sprossen bis auf 66 %.

Vergleicht man das Ergebnis mit der entsprechenden Konzentration des Extraktes A, so läßt sich daraus schließen, daß das Eluat durch die chromatographische Trennung und durch die anschließende Aufarbeitung nichts an vermehrungsanregenden Stoffen verloren hat.

c) Beeinflussung der Sprossung durch die mit Wasser eluierten Vorfraktionen

Eine quantitative Bestimmung der Trockensubstanzmenge der gesamten wässerigen Vorfraktionen hatte nach 24 Stunden Lyophilisation ergeben, daß in ihnen acht Milligramm Trockensubstanz pro Milliliter Extrakt A (Perchlorsäureextrakt) enthalten sind, d.h. daß von 19 Milligramm Trockensubstanz pro Milliliter Perchlorsäureextrakt acht Milligramm Trockensubstanz in der wässerigen Fraktion enthalten sind, also rund 45 %. Demnach enthält die säurelösliche Fraktion 55 % der Trockensubstanz des Gesamtextraktes, bei 19 Milligramm Trockensubstanz pro Milliliter Extrakt also rund 11 Milligramm.

In der folgenden Versuchsreihe sollte nun geprüft werden, ob sich die gesamten vermehrungsanregenden Faktoren in der wässerigen Vorfraktion befinden. Als Gesamtansatz dienten 11 ml einer 0,5 %igen Hefesuspension. Diesem Ansatz wurden folgende Mengen an Trockensubstanz der wässerigen Vorfraktion zugesetzt und auf Beeinflussung der Sprossung geprüft:

bezogen auf

11 ml Gesamtansatz	Milliliter Ansatz
160 mg (380 mg)*	14,6 mg (34,6 mg)*
80 mg (190 mg)	7,3 mg (18 mg)
27 mg (63 mg)	2,4 mg (5,7 mg)
8 mg (19 mg)	0,73 mg (1,8 mg)

* Die Zahlen in Klammern geben die entsprechenden Mengen Trockensubstanz an Extrakt A an, aus denen die wässerigen Vorfraktionen gewonnen wurden.

Falls sich die gesamten vermehrungsanregenden Faktoren in der wässerigen Vorfraktion befinden, müßten sich 7,3 Milligramm der wässerigen Vorfraktion und 18 Milligramm Extrakt A (Tabelle 7), bezogen auf Milliliter Ansatz, in ihrer Beeinflussung der Sprossung entsprechen.

Wie aus Abb.7 und Tabelle 14 jedoch hervorgeht, kam es nach Zusatz von 7,3 Milligramm Trockensubstanz der wässerigen Vorfraktion nach 2 1/2 Stunden zu einem Sprosungsmaximum von 79 %. Nach Zusatz der entsprechenden Menge an Extrakt A (18 mg / ml) lag das Maximum der Sprossung nach der gleichen Zeit um etwa 10 % höher, also bei 88 % ($\pm$ 3), beim Gesamteluat (säurelösliche + wässerige Fraktion) sogar um 15 % höher, nämlich bei 94 %. Diese Differenzen von 10 bzw. 15 % müssen als real angesehen werden, da die Schwankungsbreite der einzelnen Werte nur bei 2 - 4 % lag.

Ähnlich wie bei Zusatz der verschiedenen Kochsäfte bzw. Perchlorsäureextrakt (18 mg / ml) kam es auch hier zu einer Abstoßung der Sprossen. Nach acht Stunden lagen die mittleren Werte bei 43 %.

Durch Verdopplung der Endkonzentration durch Zusatz von 14,6 mg / ml Ansatz konnte der Beginn der Sprossung um 30 Minuten beschleunigt werden. Sie begann bei Zusatz dieser Menge schon zwischen der 30. und 60.Minute. Bei Zusatz von 7,3 mg wurden die ersten neuen Sprossen zwischen der 60. und 90. Minute gebildet.

Der Versuch mit 2,4 mg / ml Ansatz, der einer Konzentration des Perchlorsäureextraktes von 6 mg / ml entspricht, ergab nach drei Stunden ein Maximum von 48 %. Dieses lag also um etwa 30 % niedriger als bei der dreifach stärkeren Konzentration (79 %) und um 28 % niedriger als bei der betreffenden Perchlorsäureextraktkonzentration. Die Abstoßung der Sprossen begann in der vierten Stunde. Nach acht Stunden lag sie bei 30 %.

Der Zusatz von 0,73 mg / ml zeigte keine stärkere Beeinflussung der Sprossung als die Kontrolle. Wie bei

dieser kam es auch hier erst nach der sechsten bis siebenten Stunde zu einer Zunahme an gesproßten Zellen. Nach zehn Stunden hatten 25 % der Zellen Sprossen gebildet.

Nachdem die Untersuchung der gesamten wässerigen Vorfraktion ergeben hatte, daß in ihr sprossungsanregende Faktoren enthalten sind, wurde im folgenden Abschnitt geprüft, in welcher dieser sechs Fraktionen die vermehrungsanregenden Substanzen enthalten sind. Die sechs wässerigen Fraktionen wurden als Vo I - VI bezeichnet.

Da zu ihrer Prüfung die Eluatmenge für mehrere vergleichende Versuche nicht ausreichte, wurde zur Gewinnung großer Mengen dieser Fraktionen die im methodischen Abschnitt auf S.16 beschriebene große Säule von 156 cm Länge und 3 mm Ø benutzt. Auf diese Säule wurden 5130 mg Extrakt (270 ml Perchlorsäureextrakt) aufgetragen. Um wieder eine Bezugsgröße zu gewinnen, wurden die einzelnen wässerigen Fraktionen lyophilisiert.

Es fielen folgende Trockensubstanzmengen an:

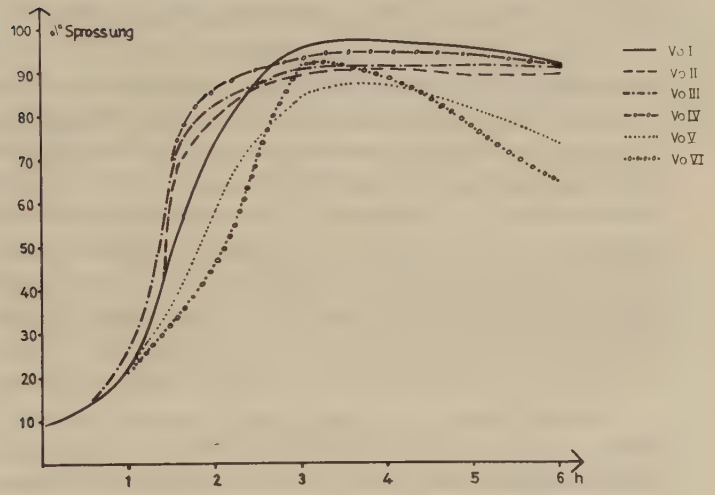
Fraktion Vo	I:	2066 mg
Fraktion Vo	II:	12 mg
Fraktion Vo	III:	12 mg
Fraktion Vo	IV:	7 mg
Fraktion Vo	V:	11 mg
Fraktion Vo	VI:	13 mg

Für die Keimversuche wurden pro Milliliter Ansatz eingesetzt (Abb.8 und Tabelle 15):

Fraktion Vo	I:	42 mg
Fraktion Vo	II:	0,36 mg
Fraktion Vo	III:	0,36 mg
Fraktion Vo	IV:	0,21 mg
Fraktion Vo	V:	0,33 mg
Fraktion Vo	VI:	0,39 mg

Bei Zusatz dieser Konzentrationen zeigten alle sechs Fraktionen eine deutlich positive Beeinflussung der Sprossung. Nach drei Stunden wurde das Sprossungs-

Sprossungsverlauf nach Zusatz der wässerigen Fraktionen nach Säulenchromatographie (Vo I - VI)



A b b i l d u n g 8

Beeinflussung der Sprossung durch Zusatz der mit Wasser eluierten Fraktionen nach Trennung durch Säulenchromatographie

(Zugesetzte Menge Trockensubstanz pro Milliliter Ansatz siehe S. 40.)

maximum erreicht. Es lag bei allen Fraktionen um 90 %.

Bei Auswertung dieser Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß es sich um 0,1 %ige Hefesuspension gehandelt hat, im Gegensatz dazu wurde die gesamte wässerige Fraktion einer 0,5 %igen Hefesuspension zugesetzt.

Bei den Fraktionen Vo I - IV kam es bis zum Ende der fünften Stunde zu keiner Abstoßung der Sprossen, dagegen wurden bei Vo V und Vo VI nach fünf Stunden nur noch 75 % bzw. 65 % der sprossenden Zellen gezählt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit der gesamten wässerigen Vorfraktion zeigen, daß sich die sprossungsfördernden Substanzen nicht allein in der wässerigen Vorfraktion befinden, sondern daß ein Teil dieser Faktoren auch in der säurelöslichen Fraktion enthalten sein muß. Jedoch zeigen die Versuche mit den einzelnen wässerigen Fraktionen, daß es auch durch Zusatz größerer Mengen der vorhandenen Fraktionen gelingt, eine Beschleunigung der Sprossung zu erzielen. Demnach ist der Ablauf der Sprossung sowohl von der Art der zugesetzten Stoffe als auch von der zugesetzten Konzentration abhängig.

Weiter lassen die Ergebnisse vermuten, daß in den Fraktionen Vo I - IV nur Faktoren für die Anregung der Sprossung enthalten sind, in Vo V und Vo VI dagegen sprossungsanregende und sprossenabstoßende Substanzen.

d) Beeinflussung der Sprossung durch die säurelösliche Fraktion

Wie die Versuche mit den wässerigen Vorfraktionen gezeigt haben, muß ein Teil der vermehrungsanregenden Faktoren in den säurelöslichen Fraktionen enthalten sein.

Zu ihrer Untersuchung wurden 190 mg Extrakt A (10 ml Perchlorsäureextrakt) auf die 126 cm lange Austauschersäule aufgetragen. Nach Elution und Einengung im Rotationsverdampfer wurde die gesamte säurelösliche Fraktion lyophilisiert und anschließend in 10 ml aqua

demin. gelöst. Da die säurelösliche Fraktion 55 % der Trockensubstanz des Gesamtextraktes ausmacht, sind also in dieser Gesamtfraktion, gewonnen aus 190 mg Extrakt 110 mg Trockensubstanz enthalten.

Der Keimansatz war folgender:

10 ml Eluat (gesamte säurelösliche Fraktion)
1 ml konzentriertes Nährsalz
55 mg synchronisierte Hefe

Bei Zusatz dieser Eluatmenge lag die Sprossung nach drei Stunden bei 37 % (Abb.9 und Tabelle 14). Nach fünf Stunden hatten maximal 54 % der Zellen Sprossen gebildet. Die sprossungsanregende Wirkung der gesamten säurelöslichen Fraktion, gewonnen aus 19 mg Extrakt A entspricht damit etwa der Wirkung von 2 Milligramm Extrakt A pro Milliliter Ansatz.

Zur Untersuchung der einzelnen säurelöslichen Fraktionen wurden 570 mg Extrakt A auf die 126 cm lange Säule aufgetragen. Die einzelnen Fraktionen wurden nach Gefriertrocknung in 3 ml aqua demin. gelöst. Es wurde folgender Ansatz gewählt:

3,3 ml 0,1 %ige Hefesuspension.

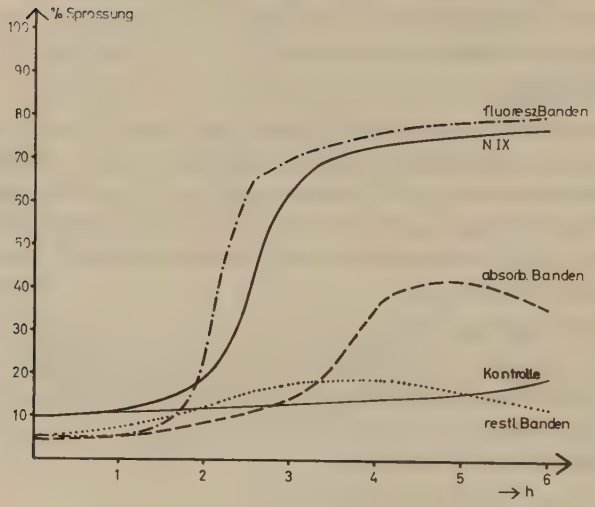
Bei der Kontrolle setzte er sich zusammen aus:

3,0 ml Wasser
0,3 ml konzentriertem Nährsalz
3,3 mg synchronisierter Hefe.

Die einzelnen Fraktionen wurden in folgenden Mengen den Ansätzen zugefügt: 3 ml, 2 ml und 1 ml, d.h. Gesamtfraktion, 66 % und 33 % der einzelnen Proben.

In diesen Versuchen zeigte nur N IX eine vermehrungsfördernde Wirkung. Das Hauptinteresse der nun folgenden Untersuchungen galt daher dieser Fraktion.

Sprossungsverlauf nach Zusatz von N IX Banden nach Schichtchromatographie



A b b i l d u n g 9

Beeinflussung der Sprossung durch Fraktion N IX und durch die schichtchromatographisch aufgetrennten N IX-Banden

N IX = Gesamtfraktion, gewonnen aus 570 mg Extrakt A
fluoresz. Banden = A, B, D, E, G und H-Banden
absorb. Banden = C und F-Banden
restl. Banden = sie zeigten weder Absorption noch Fluoreszenz

Auftragsmenge: Auf vier Platten wurden 3,6 ml von insgesamt 6,0 ml Gesamtfraktion aufgetragen.

Zur vorläufigen Charakterisierung diente ein UV-Spektrum und die daraus gewonnenen Quotienten

$$E_{250} / E_{260} = 0{,}8360$$

$$E_{280} / E_{260} = 0{,}4528$$

In fünf Versuchen, in denen die gesamte Fraktion N IX zugesetzt wurde (gewonnnen aus 570 mg Extrakt) (Abb.9 und Tabelle 16), zeigte sich folgender Verlauf der Sprossung. Nach fünf Stunden lag das Sprossungsmaximum bei 75 % (± 2,5), nach sechs Stunden bei 78 % (± 3,3). Nach acht Stunden lagen die Werte noch bei 76 % (± 4,62).

3. Beeinflussung der Sprossung durch schichtchromatographisch aufgetrennte Banden

a) Beeinflussung der Sprossung durch Banden der wässerigen Vorfraktionen Vo V und Vo VI

Mit Hilfe von Cellulose-Schicht-Platten und dem Fließmittel nach WYATT[27] (Beschreibung S.23 und 24) gelang es, alle mit Wasser eluierten Fraktionen weiter in Banden aufzutrennen.

Im Keimversuch wurden nur die Banden von Fraktion Vo V und Vo VI (Abb.10) untersucht, da diese als Gesamtfraktion zugesetzt, eine Abstoßung der Sprossen zwischen der dritten und sechsten Stunde gezeigt hatten (Abb.8 und Tabelle 15). Durch Prüfung dieser Banden sollte untersucht werden, ob es eine Substanz gibt, die speziell den Abstoßungsprozeß der Sprossen beschleunigt.

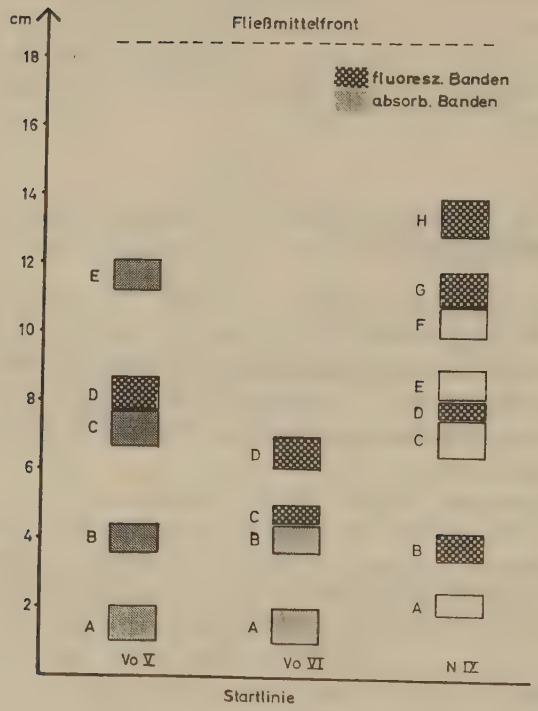
Bei einer Auftragsmenge von 4370 mg Extrakt A (Perchlorsäureextrakt) auf die 156 cm lange Austauschersäule wurden

3 mg der Fraktion Vo V, = 30 % von 9 mg der Gesamtfraktion

und 1,8 mg der Fraktion Vo VI, = 16 % von 11 mg der Gesamtfraktion,

auf Cellulose-Schicht-Platten chromatographiert. Nach

Schichtchromatogramm
von Vo V, Vo VI u N IX



A b b i l d u n g 10

(Rf-Werte s.Tabelle 3, Seite 53)

Elution der einzelnen Banden mit aqua demin. und Einengung auf 1,0 ml wurden sie im Keimversuch getestet.

Es wurde folgender Gesamtansatz gewählt:

1,1 ml 0,1 %ige Hefesuspension
1,0 ml Eluat
0,1 ml konzentriertes Nährsalz
1,1 mg synchronisierte Hefe

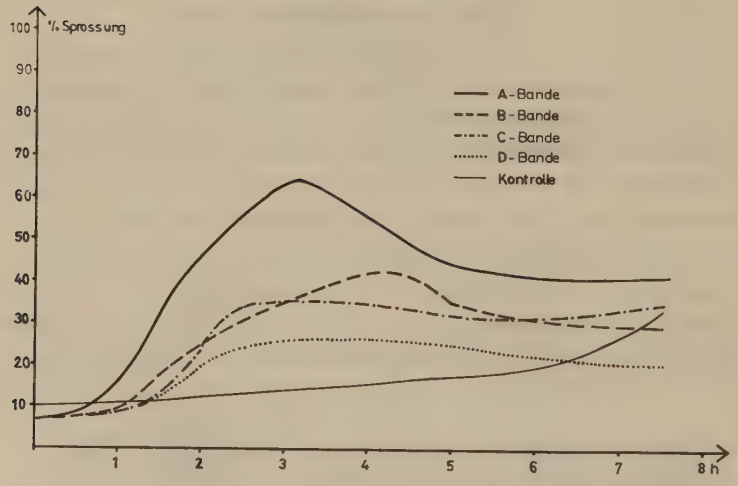
In beiden Fällen zeigten jeweils nur die absorbierenden A-Banden (Abb.11 und 12 und Tabelle 15) eine Anregung der Sprossung. Bei der A-Bande von Vo V hatten nach drei Stunden 64 %, bei der A-Bande von Vo VI zur gleichen Zeit 55 % der Zellen Sprossen gebildet.

Dagegen war die Sprossung bei Zusatz der übrigen Banden nur wenig stärker als jene der Kontrolle. Von diesen war die B-Bande von Fraktion Vo V nach vier Stunden mit 42 % noch am deutlichsten positiv. Die E-Bande von Vo V wurde noch nicht im Keimversuch geprüft.

b) Beeinflussung der Sprossung durch Banden der säurelöslichen Fraktion N IX

Für diesen Versuch wurden 570 mg Extrakt A auf die 126 cm lange Austauschersäule aufgetragen. Nach Lyophilisation wurde die gesamte Fraktion N IX in 6 ml aqua demin. gelöst. Von diesen 6 ml wurden 3,6 ml auf vier Cellulose-Schicht-Platten chromatographiert. Die Prüfung der Banden erfolgte in drei Proben:
Probe 1 setzte sich zusammen aus den absorbierenden C- und F-Banden; diese wiesen im UV-Bereich ein Absorptionsmaximum bei 260 mμ und ein -minimum bei 239 mμ auf.
Probe 2 enthielt alle fluoreszierenden und die zwei schwach absorbierenden A- und E-Banden. Diese besaßen im UV-Bereich kein Absorptionsmaximum und -minimum.
Probe 3 enthielt die Banden, die weder Absorption noch Fluoreszenz zeigten, in denen aber phosphorhaltige Stoffe enthalten sein müssen, da der Nachweis mit Ammoniummolybdat-Sprühreagenz positiv war.

Sprossungsverlauf nach Zusatz von Vo.V Banden
nach Schichtchromatographie



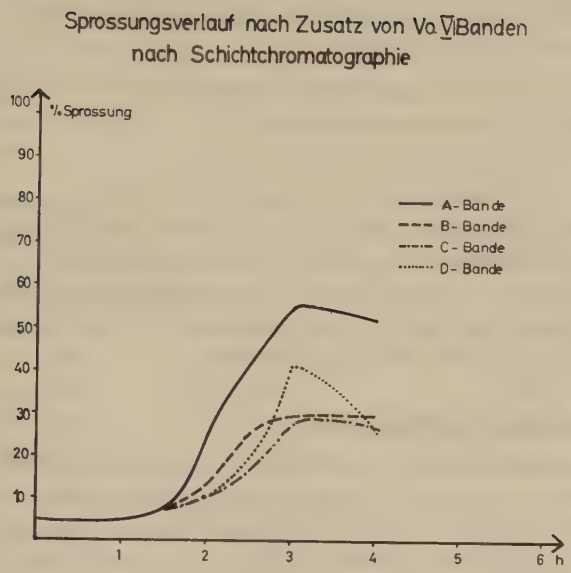
A b b i l d u n g 11

Beeinflussung der Sprossung durch schichtchromatographisch aufgetrennte Banden der Fraktion Vo V

Es wurden 3 mg der Fraktion Vo V, gleich 30 % von 9 mg Gesamtfraktion, auf Cellulose-Schicht-Platten chromatographiert.

Das Eluat wurde auf 1,0 ml eingeengt.

Ansatz: 1,0 ml Eluat
0,1 ml konzentriertes Nährsalz
1,1 mg synchronisierte Hefe



A b b i l d u n g 12

Beeinflussung der Sprossung durch schichtchromatographisch aufgetrennte Banden der Fraktion Vo VI

Es wurden 1,8 mg der Fraktion Vo VI, gleich 30 % von 9 mg Gesamtfraktion, auf Cellulose-Schicht-Platten chromatographiert.

Das Eluat wurde auf 1,0 ml eingeengt.

Ansatz: 1,0 ml Eluat
0,1 ml konzentriertes Nährsalz
1,1 mg synchronisierte Hefe

Der Keimversuch ergab eine eindeutige Beeinflussung der Sprossung durch die vornehmlich fluoreszierenden Banden. Nach vier Stunden hatten 76 % der Zellen Sprossen gebildet, nach sechs Stunden trugen 79 % der Zellen Sprossen (Abb.9 und Tabelle 16).

Die beiden absorbierenden Banden zeigten nach fünf Stunden ein Sprossungsmaximum von 44 % (Abb.9 und Tabelle 16).

Diese Ergebnisse sprechen stark dafür, daß nicht die absorbierenden Nucleotide, sondern andere Faktoren an der Sprossenbildung beteiligt sein müssen, die in den fluoreszierenden Banden zu suchen sind. Diese Annahme wird durch die im folgenden Abschnitt beschriebenen Versuche mit Reinnucleodiden bestätigt.

c) Wirkung von Testsubstanzen

Da aufgrund der Elutionskurve von HURLBERT[10], die im wesentlichen mit der eigenen übereinstimmte, und aufgrund gleicher Rf-Werte mit absorbierenden Banden von N VII - N IX nach Chromatographie mit dem Fließmittel nach RANDERATH und STUCK[17] (S.24) an Cellulose-Schicht-Platten in diesen Fraktionen UDP und UDP-Derivate anzunehmen sind, wurden diese in verschiedenen Konzentrationen im Keimversuch eingesetzt.

Im einzelnen wurden folgende Testsubstanzen geprüft (Tabelle 2, S.51).

Bei keinem dieser Versuche zeigte sich eine vermehrungsfördernde Wirkung.

Diese negativen Ergebnisse können als eine weitere Bestätigung aufgefaßt werden, daß die Nucleotide nicht direkt auf die Zellsprossung einwirken.

Tabelle 2

Testsubstanz	mg/3,3 ml Gesamtansatz	% Endkonzentration
einzelne Testsubstanzen		
Urazil	4	0,12
UDP	0,9 - 8,0	0,027 - 0,24
UTP	1,0	0,030
UMP	2,5	0,070
UDP-Glucose	2,0	0,060
Uridin	0,1 - 0,8	0,003 - 2,4
Nucleosidgemisch		
Uridin	0,600	0,018
+ Adenosin	0,600	0,018
+ Guanosin	0,600	0,018
+ Cytidin	0,600	0,018
+ Thymidin	0,600	0,018
Nucleosid-Basengemisch		
Adenin	0,250	0,0075
Urazil	0,250	0,0075
Guanin	0,250	0,0075
Thymin	0,250	0,0075
Uridin	0,200	0,0060
Adenosin	0,200	0,0060
Guanosin	0,200	0,0060
Cytidin	0,200	0,0060
Thymidin	0,200	0,0060

Ansatz: 3,3 ml 0,1 %ige Hefesuspension

4. Versuche zur Identifizierung von Einzelsubstanzen aus einigen Fraktionen

a) Untersuchungen an den wässerigen Vorfraktionen

Nach Chromatographie mit dem Fließmittel nach WYATT[27] an Cellulose-Schicht-Platten wurden von allen Banden die Rf-Werte bestimmt und mit jenen von Reinsubstanzen verglichen (Abb.10 und Tabelle 3 und 4).

Von den A-D-Banden der Fraktionen Vo V und Vo VI wurde außerdem ein UV-Spektrum geschrieben (Tabelle 5). Die Quotienten aus E_{250}/E_{260} und E_{280}/E_{260} dienten zur vorläufigen Charakterisierung. Zur Bestimmung des UV-Spektrums wurde so vorgegangen:

Nach Auskratzen der Banden von der Platte wurden diese mit Wasser eluiert, anschließend zur Entfernung der Cellulose dreimal bei 3500 x g zentrifugiert. Dann wurden die einzelnen Banden von Vo VI auf 3 ml, von Vo V auf 5 ml eingeengt.

Zur Bestimmung des UV-Spektrums der Vo V-Banden wurde eine Verdünnung von 1 : 3 gewählt.

Der Ansatz setzte sich zusammen aus:

0,5 ml Eluat
\+ 1,5 ml aqua demin.

Zur Bestimmung des UV-Spektrums der Vo VI-Banden diente eine Verdünnung von 1 : 9. Der Ansatz war folgender:

0,2 ml Eluat
\+ 1,8 ml aqua demin.

Bei Vo II waren die Rf-Werte der violett fluoreszierenden Banden gleich denen von Guanosin , welches ebenfalls violett fluoreszierte (Tabelle 4). Der mittlere Wert betrug 0,238.

Weiter stimmten die Rf-Werte der einzigen Bande von Vo IV mit jener von Uridin überein. Sie lagen bei 0,535 (s. Tabelle 4). Aus den Tabellen 4 und 5 geht her-

Tabelle 3

Rf-Werte der einzelnen schichtchromatographisch aufgetrennten Banden

	wässerige Vorfraktion *Fließmittel nach WYATT[27]						säurelösliche Fraktion *Fließmittel nach MICHELSON[14]					nach RANDERATH u. STUCK[17]
Frakt.	Vo I	Vo II	VoIII	Vo IV	Vo V	Vo VI	N IV	N V	N VII	NVIII	N IX	N IX
Bande												
A	0,056	0,043	0,384	0,535	0,082	0,077	0,205	0,130	0,135	0,138	0,130	0,13
B	0,397	0,238			0,245	0,245	0,297	0,205	0,316	0,344	0,211	0,154
C	0,56	0,281			0,388	0,264	0,329	0,265	0,538	0,369	0,367	0,407
D	0,79	0,384			0,450	0,356	0,373	0,373	0,630	0,440	0,400	0,677
E		0,492			0,629	0,913	0,405		0,690	0,472	0,434	
F		0,589			0,932		0,438		0,760	0,600	0,560	
G		0,632					0,465		0,815		0,606	
H							0,497				0,712	
I							0,584					
J							0,724					

unterstrichen = absorbierende Banden

nicht unterstrichen = fluoreszierende Banden

(*Fließmittel S.24 dieser Arbeit)

Tabelle 4

Rf-Werte von Banden, die mit bekannten Reinsubstanzen übereinstimmen

Fraktion	Bande	Rf-Werte	Reinsubstanz	Rf-Werte	Fließmittel (S.24)
Vo II	B	0,238	Guanosin	0,238	nach WYATT[27]
Vo IV	A	0,535	Uridin	0,535	
Vo V	B	0,245	Adenin	0,240	
Vo VI	B	0,245	Hypoxanthin	0,245	
			Inosin	0,245	
N IV	B	0,93	NAD	0,93	nach RANDERATH[16]
N V	A	0,67	AMP	0,67	
N IX	B	0,154	UDP	0,150	n.RANDERATH u.STUCK[17]
			UDP-Glucose	0,140	

Tabelle 5

Extinktionswerte der Banden von Vo V, Vo VI und N IX bei pH 6,5

Bande		250 mu	260 mu	280 mu	Max.	Min.	$E_{\frac{250}{260}}$	$E_{\frac{280}{260}}$	Ausgangsmenge in ml	Ansatz zur Messung der Extinktion ml Eluat + ml H_2O
Vo V	A	0,210	0,235	0,215	266	244	0,893	0,914		
	B	0,360	0,420	0,350	266	227	0,857	0,833		
	C	0,170	0,200	0,200	268	244	0,850	1,00	5	0,5 + 1,5
	D	0,216	0,285	0,260	268	234	0,754	0,917		
pH 8,5	B				265	228			5	0,5 + 1,5
Vo VI	A	0,250	0,305	0,180	262	232	0,814	0,590		
	B	0,240	0,240	0,130	257	231	1,006	0,541		
	C	0,090	0,110	0,130	275	246	0,818	1,181	3	0,2 + 1,8
	D	0,195	0,240	0,215	266	230	0,812	0,895		
alkal.	Adenin				264	228				
	Hypoxanthin				257	232				
N IX	A	0,070	0,065	0,040			1,076	0,615	2,8	0,2 + 1,0
	B	0,080	0,085	0,050			0,941	0,588	4,5	0,3 + 1,5
	C	0,110	0,123	0,053	260	239	0,895	0,432	2,8	0,2 + 1,0
	D	0,100	0,100	0,106			1,000	0,600	5,5	0,5 + 1,0
	E	0,150	0,145	0,110			1,034	0,758	4,5	0,3 + 1,5
	F	0,336	0,370	0,230	260	239	0,909	0,620	2,8	0,3 + 1,5
	G+H	0,525	0,400	0,370			1,071	0,755	4,5	0,5 + 1,5
	Restbande	0,920	0,925	0,77			0,994	0,832	4,5	0,5 + 1,5

vor, daß trotz gleicher Rf-Werte (0,245) der beiden Banden von Vo V und Vo VI diese nicht identisch sind, da sie ein unterschiedliches Absorptionsmaximum und -minimum aufweisen.

Bei pH 8,5 lag das Absorptionsmaximum der B-Bande von Vo V bei 265 mμ und das Minimum bei 228 mμ. Diese Werte stimmen weitgehend überein mit den bekannten Werten von Adenin, für die in alkalischer Lösung ein

Absorptionsmaximum bei 264 mμ
und Absorptionsminimum bei 228 mμ

angegeben werden*.

Der Rf-Wert von Adenin lag ebenfalls etwa auf der Höhe der B-Bande von Vo V. Er betrug 0,240 (Tabelle 4). Die weitgehende Übereinstimmung von Rf-Wert und Absorptionsmaximum und -minimum sprechen für Adenin in dieser Bande.

Bei Vo V sprechen die weitgehende Identität von Rf-Wert und von Absorptionsmaximum (257 mμ) und -minimum (231 mμ) der B-Bande mit Hypoxanthin (257 mμ und 232 mμ) für diese Substanz. Da Inosin und Hypoxanthin gleiche Rf-Werte zeigten, besteht die Möglichkeit, daß auch noch Inosin in dieser Bande enthalten ist.

b) Untersuchungen an den säurelöslichen Fraktionen

Auf eine Identifizierung der einzelnen säurelöslichen Fraktionen wurde zunächst verzichtet, da das Hauptinteresse der Fraktion N IX galt.

Da bei gleicher Tropfgeschwindigkeit, gleichem Gradienten, gleicher Säule und sonst völlig gleicher Versuchsanordnung die freien Nucleotide in bestimmter Reihenfolge bei einem definierten pH-Wert eluiert werden, konnte durch Schreiben einer Elutionskurve mit Testsubstanzen und Vergleich der peaks mit Angaben in der

---

* entnommen den Tabellen der California Foundation for Biochemical Research, Los Angeles, Calif. und der Papst Laboratories, Milwaukee, Wisc.

Literatur eine weitgehende, für diese Versuche zunächst ausreichende Lokalisierung der Nucleotide erzielt werden, die durch Vergleich der Rf-Werte von Reinsubstanzen mit einzelnen Banden nach Chromatographie an Cellulose-Platten weiter gesichert werden konnten (Abb.1 und Tabelle 4, S.18 und S.54).

Im einzelnen wurden die Fraktionen N IV und N V und N VII - N IX schichtchromatographisch aufgetrennt und von allen Banden die Rf-Werte bestimmt (Abb.3).

Mit Hilfe des Fließmittels nach RANDERATH[16] und MN-300-Ecteola-Cellulose als Adsorbens wurde in Fraktion N IV NAD und in Fraktion N V AMP lokalisiert. Der mittlere Rf-Wert von NAD lag bei 0,93, von AMP bei 0,67 (Tabelle 4). Dieser Befund wurde durch säulenchromatographische Trennung von Testsubstanzen weiter bestätigt.

Auf Grund des Vergleichs der Elutionskurve mit jener von HURLBERT[10] und durch Schreiben einer Elutionskurve mit Testsubstanzen ist zu vermuten, daß in Fraktion N XII ATP, in Fraktion N XV GTP und in Fraktion N XVI UTP enthalten sind. Die peaks der Testsubstanzen folgten in zeitlicher Parallelität zu jenen des Extraktes.

Wegen ihrer vermehrungsanregenden Wirkung wurde die Fraktion N IX näher untersucht. Von allen Banden wurden zur vorläufigen Charakterisierung die Quotienten aus E_{250}/E_{260} und aus E_{280}/E_{260} gebildet. Von den absorbierenden C- und F-Banden wurden außerdem die Absorptionsmaxima und -minima bestimmt. Sie lagen bei beiden Banden bei gleicher Wellenlänge, nämlich das

Maximum bei 260 mμ
und das Minimum bei 239 mμ.

Zur weiteren Charakterisierung wurden von allen Banden die Rf-Werte bestimmt. Es wurden die auf S.24 angegebenen Fließmittel nach MICHELSON[14] und nach RANDERATH[17] benutzt. Als Adsorbens diente MN-300-Cellulose.

Bei Bestimmung der Rf-Werte mit dem Fließmittel nach MICHELSON[14] wurde im einzelnen wie folgt vorgegangen:

Auf die Austauschersäule wurden 570 mg Extrakt A (Perchlorsäureextrakt) aufgetragen. Nach Lyophilisation wurde die Trockensubstanz in 6,0 ml Wasser gelöst. Von diesen 6,0 ml wurden auf vier Cellulose-Schicht-Platten je 0,9 ml Eluat aufgesprüht. Die in Tabelle 5 angegebenen Rf-Werte entsprechen den Mittelwerten aus den Laufstrecken der Banden dieser vier Platten. Als Reinsubstanzen liefen UDP und UDP-Glucose mit, da aufgrund des Vergleichs der Elutionskurven von Extrakt und Reinsubstanzen diese Nucleotide in dieser Fraktion zu vermuten waren.

Annähernd gleiche Rf-Werte zeigten die C-Banden von Fraktion N IX (0,367), von UDP (0,338) und von UDP-Glucose (0,334).

Mit dem Fließmittel nach RANDERATH und STUCK[17] konnte Fraktion N IX in zwei absorbierende A- und B-Banden und in zwei fluoreszierende C- und D-Banden aufgetrennt werden (Tabelle 3 und 4). Die B-Bande mit einem Rf-Wert von 0,154 lag hier fast auf der Höhe von UDP (0,150) und von UDP-Glucose (0,140). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß in Fraktion N IX UDP und vielleicht auch UDP-Glucose enthalten sind. Es bedarf jedoch noch einer chemischen Analyse zur Bestätigung.

DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

C DISKUSSION

Durch fraktioniertes Zentrifugieren nach dem in der Diss. von JACOBI[11] beschriebenen Verfahren gelang es, aus käuflicher Bäckerhefe eine sprossungsbereite Zellpopulation von einheitlicher Größe zu gewinnen.

Aus dieser wurde durch Verbesserung der Extraktionsmethode von STOSSECK[24] ein Perchlorsäuretrockenextrakt (Extrakt A) mit einer hohen Konzentration an freien Nucleotiden, besonders an Di- und Triphosphaten, hergestellt.

Dieser Extrakt zeigte bei Zusatz von 12 - 18 Milligramm Trockensubstanz pro Milliliter die gleiche vermehrungsanregende Wirkung wie 3,3 Milligramm Trockensubstanz des bisher bekannten Kochsaftes (JACOBI[11], DEHNER[7] und STOSSECK[24]). Nach 2 1/2 Stunden hatten etwa 90 % der Zellen Sprossen gebildet. Durch Zusatz größerer Mengen an Trockensubstanz konnte mit beiden Extrakten keine weitere Beschleunigung der Sprossenbildung erzielt werden.

Ein besonders auffallendes Ergebnis war der Befund, daß durch diesen Extrakt A fast nur die Sprossenbildung, nicht aber die Abstoßung angeregt werden konnte. Nach acht Stunden wurden noch 75 % gesproßte Zellen gezählt. Bei Zugabe von 6 Milligramm Trockensubstanz oder geringeren Mengen wurde praktisch keine Abstoßung mehr beobachtet.

Im Gegensatz dazu stand die Beobachtung, daß es bei Zusatz von Kochsaft nach der dritten bis vierten Stunde regelmäßig zu einer Abstoßung der Sprossen und damit parallel laufend zu einer Erhöhung der Zellzahl kam.

Dieser Befund läßt im Kochsaft noch weitere Stoffe vermuten, welche die Abstoßung der Sprossen anregen. Diese Substanzen scheinen in geringerer Konzentration auch im Extrakt A zu sein. Dafür spricht die Beobachtung, daß es bei Zusatz von mehr als sechs Milligramm Trockensubstanz noch zu einer geringen Abstoßung der Sprossen kommt; bei Zugabe kleinerer Mengen wurden keine Sprossen mehr abgestoßen.

Aufgrund dieser Versuche scheinen mindestens zwei Faktoren für den Ablauf der Sprossung notwendig zu sein; nämlich einer für die Anregung und Bildung und einer für die Abstoßung.

Ein Unterschied in der Stoffwechselkonstellation während der beiden Vermehrungsphasen nach Zusatz von Extrakt A und Trockenkochsaft aus synchronisierten Hefezellen (Extrakt E) konnte aufgrund gleichzeitiger Bestimmungen von Sprossung, Zellzahl, RNS, DNS und freien Nucleotiden nicht gefunden werden.

Ein Vergleich der durch Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen aus Extrakt A und aus Extrakt E zeigt deutlich eine höhere Konzentration der wässerigen Vorfraktion im Extrakt E, gemessen an der Peak-Fläche; dagegen wies der Extrakt A einen höheren Gehalt an säurelöslichen Fraktionen und damit an freien Nucleotiden auf. Auffallend war beim Kochsaft gerade das Fehlen der im Perchlorsäureextrakt gefundenen sprossenanregenden N IX - Fraktion und die kleineren peaks im Bereich der Triphosphate (UTP und ATP).

Die anfängliche Vermutung, daß vor allem Nucleotide an der Anregung der Sprossung beteiligt sind, konnte nicht bestätigt werden. Weder Mischung von Basen und Nucleosiden noch Zugabe der in N IX vorhandenen Nucleotide (UDP und UDPG) zeigten eine vermehrungsfördernde Wirkung.

Es muß allerdings noch offenbleiben, ob das negative Ergebnis mit einer schlechten Permeation der vorgelegten Basen, Nucleoside und Nucleotide zusammenhängt oder, ob andere Stoffe, die nicht zum Kreise der Nucleotide und Nucleotid-Bausteine gehören, an der Zellsprossung beteiligt sind. Für die zweite Vermutung spricht der Befund, daß die Sprossung durch Zusatz von fluoreszierenden Banden der N IX-Fraktion beeinflußt werden konnte.

Die säulenchromatographische Auftrennung des Extraktes A ergab sechs mit Wasser eluierte Fraktionen, mit Vo I - Vo VI bezeichnet, und sechzehn säurelösliche Fraktionen, mit N I - N XVI bezeichnet.

Die Untersuchung der wässerigen Fraktionen im Keimtest ergab eine vermehrungsanregende Wirkung aller sechs Fraktionen von etwa 90 %. Bemerkenswert war, daß die Fraktionen Vo I - IV die Sprossenbildung nur anregten, die Abstoßung aber nicht beeinflußten. Dagegen kam es bei Zugabe von Vo V undVo VI zu einer Anregung und Abstoßung. Dieser Befund läßt vermuten, daß in Vo I - IV nur sprossungsanregende Faktoren, in Vo V und Vo VI dagegen sprossungsfördernde und sprossenabstoßende Faktoren sein müssen.

Keimversuche mit den säurelöslichen Fraktionen N I - XVI ergaben nur eine sprossungsfördernde Wirkung der N IX-Fraktion. Versuche mit den übrigen Fraktionen verliefen alle negativ.

Wegen der alleinigen Wirkung der N IX-Fraktion unter den säurelöslichen Fraktionen und der sprossungsanregenden und sprossenabstoßenden Wirkung der mit Wasser eluierten Vorfraktionen Vo V und Vo VI galt das Hauptinteresse der Prüfung und der analytischen Aufklärung dieser Fraktionen.

Die Auftrennung der wässerigen Vorfraktionen Vo V und Vo VI auf Cellulose-Schicht-Platten ergab eine Fraktionierung von Vo V in vier absorbierende und eine blau fluoreszierende Bande. Die Banden wurden als A-E-Banden bezeichnet (Abb.10, S.46).

Vo VI konnte in zwei absorbierende und zwei blau fluoreszierende Banden aufgetrennt werden. Sie wurden als A-D-Banden bezeichnet (Abb.10, S.46).

Die säurelösliche N IX-Fraktion wurde mit Hilfe des gleichen Adsorbens in vier absorbierende und in vier fluoreszierende Banden aufgetrennt, die als A-H-Banden bezeichnet wurden (Abb.10).

Keimversuche mit den einzelnen Banden zeigten eine deutlich positive Wirkung der beiden absorbierenden A-Banden von Vo V und Vo VI. Das Sprossungsmaximum lag bei der Vo V A-Bande nach drei Stunden bei 64 %, bei der Vo VI A-Bande zur gleichen Zeit bei 55 %. Die Unterschiede in der Höhe des Absorptionsmaximums lassen sich wahrscheinlich dadurch erklären, daß bei Vo V eine höhere Konzentration eingesetzt wurde.

Bemerkenswert war, daß es auch hier wieder zu einer Abstoßung der Sprossen kam, die bei Vo V am deutlichsten war, nämlich von 64 % nach drei Stunden auf 40 % nach sieben Stunden.

Dieser Befund läßt sowohl sprossenbildende als auch sprossenabstoßende Faktoren in der A-Bande von Vo V vermuten. Keimteste mit den Banden der säurelöslichen N IX-Fraktion zeigten hauptsächlich eine vermehrungsanregende Wirkung der fluoreszierenden Banden. Bei Zugabe dieser Banden zeigten nach 2 1/2 Stunden 64 % der Zellen Sprossen. Nach sechs Stunden sproßten maximal 79 %.

Im Gegensatz zur A-Bande der wässerigen Fraktion Vo V war hier auffallend, daß es zu keiner Abstoßung der Sprossen nach der dritten Stunde kam, sondern im

Gegenteil zu einer weiteren langsamen Zunahme der Sprossung. Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß in diesen Banden nur sprossungsanregende Faktoren enthalten sind.

Die Wirkung von fluoreszierenden und absorbierenden Banden auf die Sprossung lassen auf einen biochemisch multifaktoriellen Ablauf der Sprossung schließen. Es muß allerdings noch untersucht werden, ob wirklich durch das Zusammenwirken von fluoreszierenden und absorbierenden Banden ein Optimum an Wirkung erreicht werden kann.

Die zeitlichen Unterschiede in der Sprossungsbeschleunigung, sowie das manchmal unerklärliche Versagen einiger sonst wirksamer Fraktionen sprechen für eine Ansprechbarkeit der Zellen zu einem definierten Zeitpunkt.

Untersuchungen zur Identifizierung vermehrungsanregender Stoffe aus den wirksamen Banden konnten bisher nur teilweise durchgeführt werden.

Aufgrund gleicher Rf-Werte und gleicher Absorptionsmaxima und -minima ist in der B-Bande von Vo V Adenin und in der B-Bande von Vo VI Hypoxanthin zu vermuten. Ebenfalls aufgrund gleicher Rf-Werte ist in der B-Bande von Fraktion N IX UDP zu vermuten.

Eine weitere Beobachtung muß hier erwähnt werden. Die Untersuchungen wurden nämlich erheblich dadurch erschwert, daß einige fluoreszierende und absorbierende Banden gegen Tages- und insbesondere gegen UV-Licht empfindlich sind, so z.B. die A-und B-Banden von N IX, bei der unter UV-Licht-Betrachtung Veränderungen auftraten. Nach zwei bis drei Minuten waren die Banden häufig schon nicht mehr sichtbar oder nur noch sehr schwach. Im Gegensatz dazu wurde z.B. die fluoreszierende D-Bande nach längerer Lagerung und

nach häufigen Betrachtungen im UV-Licht immer deutlicher sichtbar. Es ist deshalb notwendig, die Fraktionen unter Lichtabschluß im Vakuum aufzubewahren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es gelingt, aus Hefezellen während der Vermehrungsphase sprossenanregende und -abstoßende Fraktionen zu isolieren. Es bedarf jedoch noch weiterer Isolierungs- und Identifizierungsversuche, um eine oder mehrere der vermehrungsanregenden Substanzen selbst in die Hand zu bekommen. Danach wird es möglich sein, festzustellen, welchen Schritt im Ablauf der Zellteilung diese Substanzen regulieren.

D ZUSAMMENFASSUNG

1) Durch fraktionierte Zentrifugation handelsüblicher Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae) wurden Hefezellen gleichmäßiger Größe (5,5 - 6,0 u) gewonnen, die im Vermehrungsversuch ein synchronisiertes Verhalten zeigten.

2) An solchen Zellen wurde die sprossenbildende Wirkung von Perchlorsäureextrakten und Kochsaftzubereitungen vor und nach Trennung durch Säulen- und Schichtchromatographie untersucht.

3) Die Prüfung der Extrakte ergab, daß in ihnen zwei Faktoren enthalten sein müssen: ein erster Faktor, der für die Anregung und ein zweiter, der für die Abstoßung der Sprossen notwendig ist. Im Perchlorsäureextrakt ist der zweite Faktor nur in geringen Konzentrationen vorhanden.

4) Die säulenchromatographische Auftrennung des Perchlorsäureextraktes ergab bei Elution mit Wasser sechs (Vo I - VI), bei Elution mit Puffer weitere sechzehn Fraktionen (N I - XVI).

5) Im Vermehrungstest zeigten nur die wässerigen und N IX der säurelöslichen Fraktionen eine vermehrungsanregende Wirkung. Zu einer eindeutigen Abstoßung der Sprossen kam es nur bei Vo V und Vo VI, und zwar erst nach Zusatz von hohen Konzentrationen dieser Banden.

6) Die Chromatographie der Fraktionen N IX und Vo V und VI auf Cellulose-Schicht-Platten ergab eine Auftrennung von N IX in vier absorbierende und vier fluoreszierende Banden. Vo V konnte in vier absorbierende und eine fluoreszierende, Vo VI in zwei absorbierende und zwei fluoreszierende Banden fraktioniert werden.

7) Im Keimtest zeigten nur die fluoreszierenden Banden von N IX und jeweils die absorbierenden A-Banden von Vo V und VI eine Beeinflussung der Sprossung.

8) Basen-, Nucleosid- und Nucleotidgemische waren bei dem angewendeten Test unwirksam. Es muß deshalb bezweifelt werden, ob die sprossungsanregenden und sprossenabstoßenden Faktoren zu dem Kreis der Nucleotide oder Nucleotidbausteine gehören.

E LITERATURVERZEICHNIS

1. Arnold,G. — Versuche über das Verhalten der Desoxyribonucleinsäure und der Ribonucleinsäure bei Wachstum und Vermehrung von Hefezellen unter Verwendung des Celloscopes. Diss., Marburg 1963.

2. Barrensheen, K.K. u. A. Peham — J. Phys. Chem. 272, 81 (1942).

3. Bucher,O. — Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Medizinischer Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart, 4.Auflage, S.62 (1965).

4. Cohn,W.E. — The Separation of Nucleic Acid Derivates by Chromatography on Ion-Exchange Columns. Chargraff,E. and J.N.Davidson. The Nucleic Acids. Chemestry and Biology Vol. I. Academic Press Inc., Publ. New York, 211 (1955).

5. Cohn,W.E. — The Anion-Exchange Separation of Ribonucleotides. J.Am.chem.Soc. 72, 1471 (1950).

6. Cohn,W.E. and C.E.Carter — The Separation of Adenosine Polyphosphates by Ion-Exchange and Paperchromatography. J.Am.chem.Soc. 72, 4273 (1950).

7. Dehner,R. — Über das Verhalten der Phosphorpyridinnucleotide der Hefe bei Vermehrung und Vermehrungshemmung.Diss., Marburg 1966.

8. Dische,Z. — Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonucleinsäure und eine Micromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen. MicroCh. Bd.2, 4 (1930).

9. Geiß,E. — Die Herstellung kontinuierlicher veränderlicher Mischungsverhältnisse verschiedener Flüssigkeiten für Gradientenelution in der Chromatographie und ähnliche Anwendungen. Hoppe-Seyler Z.für Phys.Chem.308, 74 (1957).

10. Hurlbert,E.B., H.Schmitz, A.F.Brumm u. R.v.Potter — Chromatographic separation of acid soluble Nucleotides. J.Biol.Ch. 209, 23 (1954).

11. Jacobi,G. — unveröffentl.

12. Koransky,W. — Trennung und Bestimmung der Nucleotide des Gehirns. Naunyn-Schmidebergs Arch.für exp. Path., Pharmakol.234, 46 (1948).

13. Meybaum,W. — Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. Hoppe-Seyler Z.für Phys.Chem.258, 117 (1939).

14. Michelson,A.M. — Polynucleotides Part I. Synthesis and Properties of some Polyribonucleotides. J.chem.Soc. 1371 (1939).

15. Randerath,K. — A comparison between thin-layer chromatography and paperchromatography of Nucleic acid derivates. Biochim. biophysica Acta Amsterdam 6, 452 (1961/62).

16. Randerath,K. — Dünnschichtchromatographie von Nucleinsäure-Derivaten an Anionenaustauscher-Schichten. Angew.Chem.73, 436 (1961).

17. Randerath,K. und H.Stuck — Dünnschichtchromatographische Trennung von Nucleinsäure-Derivaten an Cellulose-Schichten.

18. Reik,R. — Studien über Ammoniumsalze. Mh. für Chem. 23, 1033 (1902).

19. Schimasseck,H., D.Kohl u. Th.Bücher — Glycerylphosphorcholin, die Nierensubstanz "Ma-Mark", von Ullrich. Biochem.Z. 331, 87 (1959).

20. Schmid,W. — Zellwachstum und Zellvermehrung bei Hefe. Biochem.Z. 329, 560 (1958).

21. Schmid,W. — Zellvermehrung und Zellatmung bei Hefe. Z.Naturforschung 7b, 217 (1952).

22. Schmitz,H. — Isolierung von freien Nucleotiden aus verschiedenen Geweben. Biochem.Z. 325, 555 (1954).

23. Schnitger,H., H.Papenberg, E.Ganse, B.Czok u.Th.Bücher — Chromatographie phosphorhaltiger Metabolite eines menschlichen Leberpunktates. Biochem.Z. 332, 167 (1959).

24. Stosseck,K. — Differenzierung von Wachstum und Vermehrung an synchronisierten Hefezellen. Diss., Marburg 1966.

25. Wegner,A. — Diss., Marburg 1963

26. Williamson,D.H. and A.Scopes — The behaviour of Nucleic Acids in synchronously dividing cultures of Saccharomyces cerevisiae. Exp. Cell. Res. 20, 338 (1960).

27. Wyatt,G.R. — The purine and pyrimidine composition of desoxypentose nucleic acids. Biochem.Z. 48, 584 (1951).

Tabelle 6

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz von 19 mg Extrakt A (1,9 %iger Perchlorsäuretrockenextrakt) (6 mg/ml = 0,6 % Endkonzentration)

Versuchsansatz: 3,3 ml 0,1 %ige Hefesuspension
1,9 mg Extrakt + 3,0 ml aqua demin. + 0,3 ml konzentriertes Nährsalz + 3,3 mg synchronisierte Hefe

Zeit (h)	Beginn	1/2	1	1/2	2	2 1/2	3	4	5	6	7	8
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	14	17	20	30	72	78	91	83	85	94	76	75
	16	14	12	28	54	86	76	84	86	78	85	76
	14	17	20	26	64	88	82	90	90	78	82	90
	10	12	14	18	82	35	84	77	87	80	90	64
	7	11	14	19	69	90	90	95	95	89	84	70
	7	9	9	26	27	81	96	93	88	90	86	70
	6	10	13	30	72	93	88	93	94	80	90	74
	5	7	10	27	62	78	93	84	76	87	66	64
	6	9	11	12	76	64	82	84	74	93	82	84
	12	14	12	42	48	66	74	86	78	68	72	72
	12	10	11	42	44	80	78	86	96	72	81	76
	12	12	12	13	44	68	86	82	84	76		
	12	10	12	14	72	78	82	92	86	88		
	10	8	10	52	64	85	90	83	89	87		
	6	7	9	9	59	71	84	89	80	84		
	8	11	14	21	69	77	82	95		80		
	6	8	14		47	59	77	67		79		
	5	8	14		74	74	86	80				
	11	10	10		19							
	6	7	12		31							
Zahl der Versuche: n	20	20	20	16	20	18	18	18	15	17	11	11
Mittelwert: $\bar{x}$	10	11	13	27	59	75	85	85	85	82	81	74
σ_m	0,799	0,687	0,679	3,07	3,814	3,211	1,441	1,669	1,724	1,767	2,461	3,660

Tabelle 7

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz verschiedener Mengen des Extraktes A

Gesamtansatz: 3,3 ml 0,1 %ige Hefesuspension
1,9 (6,6; 19; 63) mg Extrakt A + 3 ml aqua demin. + 0,3 ml konzentriertes Nährsalz
3,3 mg synchronisierte Hefe

Zeit (h)		Beginn	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	6	7	8	Zahl der Versuche
% Sprossung		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
mg/ml	% Endkonzentration													
0,6	= 0,06	7	8	12	12	14	22	23	19	19	19	23	26	1
2	= 0,2	7	10	12	14	24	41	63	60	61	61	65	68	1
6	= 0,6	10	11	13	27	59	75	85	85	85	82	81	74	20
18	= 1,8	8	13	18	51	79	88	89	75	68	63	60	58	4

Tabelle 8

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz verschiedener Konzentrationen des nicht synchronisierten 3,6 %igen Trockenkochsaftes (Extrakt B)

Versuchsansatz: 5,5 ml 0,5 %ige Hefesuspension
1,8 (5,4; 18; 54; 162) mg Trockenkochsaft + 5 ml aqua demin. + 0,5 ml konzentriertes Nährsalz + 27,5 mg synchronisierte Hefe

Zeit (h)		Beginn	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	6	7	8	Zahl der Versuche
% Sprossung		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
mg/ml	% Endkonzentration													
0,33 =	0,033	11	13	10	21	32	22	29	17	14	11			1
0,98 =	0,098	9	11	17	36	48	53	53	60	50	39	33	27	1
3,3 =	0,33	10	12	23	71	88	91	83	67	55	45	37	30	8
9,8 =	0,98	10	13	24	77	91	92	86	75	57	40	31	21	5
29 =	2,9	11	17	18	82	90	91	91	84	63	42	39	35	1

Tabelle 9

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz des 1,2 %igen nicht synchronisierten Trockenkochsaftes (Extrakt C)

Versuchsansatz: 11,0 ml 0,5 %ige Hefesuspension
40 mg Trockenkochsaft + 10,0 ml aqua demin. + 1,0 ml konzentriert. Nährsalz + 55 mg synchronisierte Hefe

Zeit (h)	Beginn	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	6	7	8
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	6	11	15	62	85	89	93	81	77	70	54	46
	6	11	14	65	84	91	91	81	76	75	64	61
	8	5	12	48	81	83	77	64	58	53	49	46
Zahl der Versuche: n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert: $\bar{x}$	7	9	14	58	83	87	85	75	70	66	55	51
σ_m	0,707	0,577	0,913	5,245	1,225	2,449	5,228	5,666	6,174	6,634	4,434	12,25

Tabelle 10

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz des dreimal gewaschenen 1,8 %igen Trockenkochsaftes (Extrakt D)
(5,4 mg/ml = 0,54 % Endkonzentration)

Gesamtansatz: 3,3 ml 0,1 %ige Hefesuspension
18 mg Trockenkochsaft + 3 ml aqua demin. + 0,3 ml konzentriertes Nährsalz + 3,3 mg synchronisierte Hefe

Zeit (h)	Beginn	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	6	7	8
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	8	11	14	48	67	86	90	76	62	62	56	52
	8	13	18	51	82	86	90	78	64	74	54	35
	10	14	24	68	86	88	86	86	76	86	54	64
	12	10	28	64	88	87	86	82	76	64	88	56
	6	6	18	66	80	81	88	85	82	60	54	
	12	13	14	72	86	88	96	94	94			
	16	16	22	66	84	95	92	76	72			
	6	10	20	60	84	85	86	82	66			
	8	10	12		80	77	74	66	64			
Zahl der Versuche: n	9	9	9	8	9	9	9	9	9	5	5	4
Mittelwert: $\bar{x}$	10	11	19	56	82	85	88	83	73	69	61	57
σ_m	1,059	0,986	1,655	3,269	2,071	1,658	1,841	2,759	3,466	4,343	6,711	6,946

Tabelle 11

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz des 1,9 %igen synchronisierten Trockenkochsaftes (6 mg/ml = 0,6 % Endkonzentration) (Extrakt E)

Versuchsansatz: 11 ml 0,5 %ige Hefesuspension
63 mg Trockenkochsaft + 10 ml aqua demin.+ 1 ml konzentriertes Nährsalz + 55 mg Hefe

Zeit (h)	Beginn	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	6	7	8
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	5	9	12	63	78	87	92	89	78	85	83	76
	5	12	10	56	72	85	90	85	85	77	76	55
	4	6	8	32	76	79	80	76	72	76	76	76
	5	10	14	51	87	86	86	86	76	78	66	74
Zahl der Versuche: n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Mittelwert: $\bar{x}$	5	9	11	51	78	84	87	84	78	78	75	65
σ_m	0,288	1,259	1,291	6,646	3,176	2,041	2,646	2,799	2,724	2,122	3,500	5,938

Tabelle 12

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz der Kontrollösung (Nährsalz + Glucose)

Versuchsansatz: 3,0 ml aqua demin.
0,3 ml konzentriertes Nährsalz + 3,3 mg Hefe

Zeit (h)	Beginn	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	6	7	8
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	10	10	10	10	10	13	16	14	16	16	12	10
	8	10	12	12	12	12	12	10	14	14	12	10
	10	12	12	12	10	12	10	12	12	8	16	14
	10	8	8	10	14	10	10	14	10	10	11	11
	14	14	14	12	12	14	14	14	10	11	30	70
	10	10	10	14	10	13	14	12	10	20	19	75
	8	8	10	10	14	8	10	9	10	10	75	32
	6	8	9	13	12	17	17	29	40	45	16	15
	14	14	16	18	16	14	16	20	16	14	16	70
	14	13	12	14	22	16	19	16	15	14	12	68
	12	14	16	18	21	18	19	21	17	12	16	24
	16	16	16	21	14	20	18	21	16	10	14	10
	14	14	14	20	14	16	14	16	13	13	72	
	7	14	10	10	8	14	25	12	15	14		
	5	9	10	15	9	14	11	13	13	68		
	6	11	13	11	12	11	19	13	27	16		
	5	6	11	9	10	12	15	16	14	16		
	5	7	8	8	7	11	18	17	15	14		
	8	9	10	11	16	15	14	14	15			
	10	13	12	12	12	14	16	8	10			
Zahl der Versuche: n	20	20	20	20	20	20	20	20	20	18	13	12
Mittelwert: $\bar{x}$	10	11	12	12	13	13	15	16	16	19	27	39
σ_m	0,767	0,638	0,569	0,839	0,861	0,643	0,856	1,240	1,560	3,501	6,194	8,133

Tabelle 13

Simultanvergleich von Extrakt A und Extrakt E mit Be

Gesamtansatz: 1

1140 mg Extrakt A (bzw. Extrakt E) + 180 ml aqua dem

Zeit h	Extrakt A					Extrakt E	
	Sprossung %	Zellzahl /mm³	freie Nucleotide	RNS	DNS	Sprossung %	Ze za
			Extinktion				
Beginn	8	58ooo	0,155	0,503	0.078	6	
1/2	12					12	
1	22					38	
1 1/2	62					76	
2	80	62ooo				80	
2 1/2	84		0,546	0,769	0,135	90	
3	86					86	
4	84	57ooo				84	
5	80		1,060	0,836	0,151	82	
6	82	60ooo				86	
7	78					76	
8	76	56ooo				72	
9	76					66	
10	76	69ooo	0,8/1	0,901	0,141	64	
11	76					60	

Zellzahl, Sprossung, RNS, DNS und freien Nucleotiden

Hefesuspension

nzentriertes Nährsalz + 990 mg synchronisierte Hefe

k t E			K o n t r o l l e				
o-	RNS	DNS	Sprossung %	Zellzahl /mm³	freie Nucleotide	RNS	DNS
i n k t i o n					E x t i n k t i o n		
	0,508	0,100	6	54000	0,118	0,463	0,093
			10				
			14				
			14				
			14	53000			
	0,890	0,153	22		0,420	0,549	0,113
			34				
			34				
	0,866	0,172	36		0,446	0,558	0,111
			36	54000			
			29				
			30	53000			
			24				
	0,938	0,184	20	87000	0,500	0,612	0,109

Tabelle 14

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz von säulenchromatographisch aufgetrennten Fraktionen

Gesamtansatz: 11 ml 0,5 %ige Hefesuspension
10 ml Eluat + 1 ml konzentriertes Nährsalz + 55 mg synchronisierte Hefe

Es wurden jeweils 190 mg (= 10 ml) des 1,9 %igen Perchlorsäuretrockenextraktes (Extrakt A) auf die Säule aufgetragen.

Zeit (h)	Beginn	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	6	7	8	Zahl der Versuche
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
mg Trockensubstanz/ml Ansatz													
10 ml Gesamteluat (19 mg)	6	8	13	51	85	94	93	95	94	84	72	66	1
10 ml säurelösliche Fraktion (10 mg)	4	10	6	17	25	32	39	50	54	46	44	42	1
10 ml wässerige Vorfraktion (7,3 mg)	7	9	8	19	59	79	79	75	67	63	58	46	4
3,3 ml wässerige Vorfraktion (2,4 mg)	5	8	8	16	29	34	48	47	42	36	36	30	1
1,0 ml wässerige Vorfraktion (0,73 mg)	5	8	7	7	17	13	17	12	13	14	22	21	1
14,6 mg wässerige Vorfraktion	8	13	17	31	70	80	84	75	45			34	

Tabelle 15

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz der mit Wasser eluierten Vorfraktionen Vo I-VI

Gesamtansatz: 3,3 ml 0,1 %ige Hefesuspension
(Auf die Säule wurden 5130 mg Perchlorsäuretrockenextrakt aufgetragen)

Zeit (h)	Beginn	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	6	7	Zahl der Versuche
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Vo mg/ml % Endkonzentration												
Vo I 42 = 4,2 %	6	15	22	53	73	89	96	97	94	92	90	1
Vo II 0,36 = 0,036 %	12	17	19	65	67	87	91	91	90	90	90	1
VoIII 0,36 = 0,036 %	8	14	26	71	83	86	88	86	89	91	94	1
Vo IV 0,21 = 0,021 %	15	14	14	75	83	81	93	94	93	93	92	1
Vo V 0,33 = 0,033 %	4	15	13	37	60	78	85	87	80	74		1
Vo VI 0,39 = 0,039 %	5	18	14	34	46	72	92	69	72	65		1
Vo I 4,2 = 0,42 %	5	5	18	21	31	63	54	62	65			1
Vo II 0,036 = 0,0036 %	8	7	10	11	17	36	46	52	75			1

Tabelle 16

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz der säurelöslichen Fraktion N IX und der schichtchromatographisch aufgetrennten Banden

Gesamtansatz: 3,3 ml 0,1 %ige Hefesuspension

Auf die Säule wurden 570 mg Perchlorsäuretrockenextrakt aufgetragen.

Auf 4 MN-300-Cellulose-Schicht-Platten wurden 3,6 ml von insgesamt 6,0 ml Gesamtfraktion aufgetragen.

Zeit (h)	Beginn	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	6	7	8	Zahl der Versuche
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
N IX X	10	10	12	14	18	39	64	68	75	78	77	76	5
σ_m	0,183	1,061	1,058	2,00	3,271	8,195	8,963	9,274	2,517	3,317		4,619	
fluoreszierende Banden (A,B,D,E,G u.H)	5	6	7	8	23	64	68	76	67	79			1
absorbierende Banden (C u.F)	4	6	6	8	10	14	14	37	42	35			1
Restbanden	5	7	8	9	12	14	18	15	14	12			1

Tabelle 17

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz von schichtchromatographisch aufgetrennten Banden der wässerigen Vorfraktionen Vo V und Vo VI

Gesamtansatz: 1,1 ml 0,1 %ige Hefesuspension

Auf die Säule wurden 4370 mg Perchlorsäuretrockenextrakt aufgetragen.

Auf die Platte wurden aufgetragen: 3 mg Vo V = 30 % von 9 mg Gesamtfraktion
1,8 mg Vo VI = 16 % von 11 mg Gesamtfraktion

Zeit (h)	Beginn	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	7 1/2
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Vo V A abs.	7	8	14	33	45	52	64	54	41	40
B abs.	7	8	9	18	25	28	35	42	35	28
C abs.	8	7	9	14	24	34	34	34	32	34
D fluor.	6	6	8	16	20	24	24	26	20	20
Vo VI A abs.	5	6	6	7	25	32	55	53		
B abs.	5	6	6	6	12	26	27	29		
C fluor.	5	6	6	6	10	14	28	27		
D fluor.	5	5	5	6	20	18	41	26		

abs.= absorbierende Banden

fluor.= fluoreszierende Banden

Zum Schluß der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Schmid für die freundliche Aufnahme im Pharmakologischen Institut, für das Thema der Arbeit, sowie für sein verständnisvolles Entgegenkommen in fachlichen und persönlichen Fragen herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. W. Kunz
danke ich für die Übernahme des Correferates.

Herrn Dr. Erich Weil danke ich für die freundliche Überlassung zweier Fotos, sowie für seine zahlreichen Hilfeleistungen und Ratschläge.

Fräulein Koch danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 11. März 1938 wurde ich als dritter Sohn der fünf Kinder des Gutspächters Fritz Wortberg und dessen Gemahlin Maria Wortberg, geb. Freitag, in Essen geboren.

Vom Frühjahr 1945 bis Frühjahr 1946 besuchte ich in Kettwig vor der Brücke die Volksschule, anschließend bis Frühjahr 1949 die einklassige Volksschule in Essen-Holsterhausen.

Mit Abschluß der vierten Volksschulklasse ging ich auf das Städtische Neusprachliche Gymnasium Essen-Werden, wo ich am 3. März 1959 meine Reifeprüfung ablegte.

Im gleichen Jahr zum Sommersemester begann ich mit dem Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg/Lahn. Nach zweisemestrigem Studium bestand ich in Marburg am 23. April 1960 die naturwissenschaftliche Vorprüfung. Nach dem sechsten Semester, am 6. März 1962, legte ich ebenfalls in Marburg die ärztliche Vorprüfung ab. Im Sommersemester 1962 setzte ich mein Studium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms - Universität Bonn fort. Ab Wintersemester 1962/63 studierte ich wieder in Marburg und bestand dort am 23. November 1965 das medizinische Staatsexamen.

Vom 15. Januar 1966 bis zum 31. Dezember 1966 war ich als Medizinalassistent am Pharmakologischen Institut Marburg/Lahn tätig, anschließend bis zum 31. Juli 1967 als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle. Während der Tätigkeit am Pharmakologischen Institut fertigte ich meine Dissertationsarbeit an.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

an der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Berendes, Bickel, Braun-Falco, Brück, Bücher, Dimroth, Dittrich, Dölle, Exner, Gedigk, Golenhofen, Grüter, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jakob, Keßler, Linneweh, Mahr, Mann, Martini, Mattes, du Mesnil, Niessing, Oehme, Oksche, Overbeck, Petry, Rohen, Salfeld, Sauer, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schrappe, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Stender, Straub, Streicher, Vogell, Vogt, Walcher, Wendt, Würterle.

an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

Bayer, Böhm, v. Eiff, Habs, Hamperl, Heymer, Janker, Lange, Langendörfer, Leydhecker, Mehmke, Mundt, Oberhoffer, Puck, Schaede, Tünnerhoff, Voerlander.